

hP  
TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition 02 décembre 1999 (02.12.99)	
Demande internationale no: PCT/FR99/01247	Référence du dossier du déposant ou du mandataire: MD/B05B3145
Date du dépôt international: 27 mai 1999 (27.05.99)	Date de priorité: 27 mai 1998 (27.05.98)
Déposant: MOUGIN, Bruno etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:27 septembre 1999 (27.09.99)☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:2. L'élection ☒ a été faite☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  J. Zahra no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 30 AUG 2000

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3145	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01247	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27/05/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 27/05/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68		
Déposant BIO MERIEUX et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 11 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 27/09/1999	Date d'achèvement du présent rapport 25.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Wagner, R N° de téléphone +49 89 2399 7357 

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01247

**I. Bas du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1,6,7,9-21,24	version initiale			
2,2a,3-5,8,22, 23	reçue(s) le	23/05/2000	avec la lettre du	23/05/2000

**Revendications, N°:**

1-12	reçue(s) le	23/05/2000	avec la lettre du	23/05/2000
------	-------------	------------	-------------------	------------

**Dessins, feuilles:**

1/7-7/7	version initiale
---------	------------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☒ des revendications, n°s : 13
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01247

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-2
	Non : Revendications 3-12
Activité inventive	Oui : Revendications 1-2
	Non : Revendications 3-12
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VI. Certain documents cités**

**1. Certains documents publiés (règle 70.10)**

et / ou

**2. Divulgations non écrites (règle 70.9)**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: GB-A-2 293 238 (INCELTEC LTD ;WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 mars 1996 (1996-03-20)

D2: WO 96 40992 A (ABBOTT LAB) 19 décembre 1996 (1996-12-19)

D3: WO 94 03630 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC ;ADAMS CRAIG W (US); DANIELS DAVID W (US)) 17 février 1994 (1994-02-17)

1. Les documents WO9828443 et BI and STAMBROOK, Nucleic Acids Research, vol. 26, no.12, 1998, cités comme document "P, X" dans le rapport de recherche international ne font pas partie de l'état de la technique comme la priorité de la présente application paraît être valable (règle 64.1 PCT). Le document WO9828443 pourrait cependant faire partie de l'état de la technique dans une phase nationale ou régionale (comme par exemple à l'OEB).
2. Le procédé d'amplification des revendications 1 et 2 est nouveau (article 33(2) PCT) car la technique antérieure ne dévoile pas de procédé utilisant des séquences de blocage spécifiques pour des séquences nucléotidiques apparentées à la séquence particulière à amplifier. D1 décrit à la page 11 un procédé qui utilise des amorces qui entrent en compétition avec les amorces spécifiques de la séquence à amplifier. Ces amorces bloquantes sont modifiées de manière à empêcher leur élongation. La méthode de D1 améliore donc la spécificité de l'amplification par compétition entre amorces. Dans la présente invention une seule amorce, qui n'est pas parfaitement spécifique pour la séquence cible, peut être utilisée pour obtenir une amplification spécifique en bloquant l'amplification des séquences apparentées par des séquences de blocage spécifiques pour des parties caractéristiques de ces séquences apparentées. L'état de la technique ne donne aucune indication que la spécificité de l'amplification d'une séquence cible peut être augmentée par rapport aux

séquences apparentées en utilisant des séquences de blocage durant l'amplification. Voilà pourquoi l'objet des revendications 1 et 2 implique une activité inventive (article 33(3) PCT).

3. La revendication 3 et les revendications dépendantes 4-12 doivent être interprétées comme visant un produit c.-à-d. un oligonucléotide utilisable entre autre pour bloquer un procédé d'amplification selon les revendications 1 et 2 (directives PCT III-4.8). L'objet de la revendication 3 est donc uniquement caractérisé par le fait que le produit est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides. L'objet de la revendication 3 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT) car par exemple D1 (page 16, ligne 4) dévoile un oligonucléotide.
4. L'objet des revendications 4 et 5 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car les oligonucléotides de D1 (page 11, dernière ligne) et D3 (pages 48 ligne 25 et page 49 ligne 13) comportent un élément (ddNTP), situé à l'extrémité 3', qui empêche l'amplification.
5. L'objet de la revendication 6 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car D2 dévoile à la page 11 un oligonucléotide qui comprend à son extrémité 5' une séquence protectrice tige-boucle. D2 décrit aussi une technique de protection de l'extrémité 5' d'une amorce par l'insertion de molécules "encombrantes" à l'extrémité 5'.
6. L'objet des revendications 7 et 10 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car D2 (page 11, milieu) dévoile des oligonucléotides (tige-boucles) qui s'hybrident sur les amorces pour empêcher l'amplification.
7. L'objet de la revendication 8 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car D3 (page 13, milieu) dévoile des oligonucléotides comprenant des molécules comme la digoxine, biotine, différentes d'un nucléotide. Ces oligonucléotides empêchent l'amplification en s'hybridant sur l'amorce.
8. L'objet de la revendication 9 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car D1 (page 26, ligne 5) dévoile un oligonucléotide bloquant l'amplification non spécifique. Cet oligonucléotide est formé de 21 nucléotides et contient un ddNTP en 3'.

9. L'objet de la revendication 11 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT) car D3 dévoile à la page 93, lignes 1-3 un oligonucléotide bloquant se terminant à l'extrémité 3' par le dideoxy-GTP, c.-à-d un nucléotide dont le groupement -OH en 3' du ribose est remplacé par un -H.
10. L'objet de la revendication 12 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT), car les éléments protecteurs contre l'activité des exonucleases comme le thiophosphate ou une boucle situées en 5' du ribose du côté 5' du nucléotide sont bien connus par l'homme du métier.

**Concernant le point VI****Certains documents cités**

Le document suivant, publié (règle 70.10) après la date de la priorité de la présente demande n'est pas considéré comme faisant parti de l'état de la technique dans cet examen préliminaire, mais pourrait jouer un rôle dans l'examen de la nouveauté dans une phase régionale ou nationale.

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
WO 98 28443	02.07.1998	17.12.1997	20.12.1996 et 6.11.1997

**Concernant le point VIII****Observations relatives à la demande internationale**

Dans la revendication 12 il n'est pas clair si l'amorce de la revendication 12 ou l'élément protecteur est dérivé des revendications 4, 6 et 12. L'élément protecteur ne fait pas parti de l'objet de la revendication 4. La revendication 12 n'est donc pas claire (article 6 PCT).

une amorce complémentaire tout aussi spécifique. Toutefois, d'autres problèmes peuvent apparaître lors du choix de la séquence à utiliser pour l'hybridation de l'amorce. En effet, il arrive que la région réellement spécifique soit unique et se trouve à l'intérieur de la séquence d'intérêt. Le choix d'hybrider une amorce au niveau d'une telle région implique de n'obtenir qu'une fraction plus ou moins importante de ladite séquence d'intérêt. On a donc une perte d'information. De plus, l'obtention d'une amorce spécifique de la séquence nucléotidique d'intérêt apporte un surcroît important de difficulté et de travail.

*Le document GB-A-2 293 238 propose des séquences de blocage qui sont associées à des amorces qui permettent l'amplification. Deux cas de figure sont à distinguer. Premièrement, les séquences de blocage sont légèrement différentes des amorces destinées à l'amplification. Lors de leur utilisation, il y aura compétition entre ces deux types d'amorces afin d'éviter de mauvais appariements et des amplifications non spécifiques. Deuxièmement, les amorces pour l'amplification sont en amont de la séquence cible à amplifier, alors que les séquences de blocage sont différentes et situées en aval de ladite séquence cible, de sorte que le produit de l'amplification sera de taille connue, l'amorce de blocage empêchant la continuité de l'élongation. Dans tous les cas, le blocage est réalisé par l'intermédiaire de ddNTP en position 3'.*

*Le document WO-A-96/40992 décrit un procédé d'amplification selon lequel on utilise des amorces masquées qui deviennent fonctionnelles dès que nécessaire. De telles amorces sont à titre d'exemple obtenues par blocage à l'aide d'un nucléotide, notamment en forme de boucle.*



Avec la présente invention, on s'affranchit des risques d'obtention de produits d'amplification tronqués et des difficultés à obtenir des amorces spécifiques de la séquence nucléotidique à amplifier, puisqu'il est possible d'amplifier spécifiquement la séquence nucléotidique d'intérêt dans des conditions d'hybridation classiques.

5 Pour ce faire, on utilise deux types d'amorces complémentaires, d'une part, un type d'amorces qui s'hybride indifféremment sur toutes les séquences nucléotidiques apparentées et, d'autre part, un type d'amorces où chaque amorce s'hybride sur une seule de ces séquences apparentées. Les premières, qui sont non-spécifiques, vont servir d'amorces pour l'élongation, les secondes, spécifiques de séquences nucléotidiques  
10 apparentées à la séquence d'intérêt, vont servir <sup>de séquences</sup> d'amorces de blocage de l'élongation de certaines de ces séquences nucléotidiques apparentées.

Dans le cas où on utilise un mélange d'amorces non spécifiques et spécifiques, selon le choix du type de séquences spécifiques utilisées, on peut empêcher l'élongation  
15 de certaines séquences non spécifiques. Il est alors possible de sélectionner les amplicons que l'on obtient.

Ainsi, on peut bloquer l'amplification de certaines séquences apparentées que l'on ne souhaite pas amplifier, par l'intermédiaire d'un ajout de séquences complémentaires, spécifiques de ces séquences apparentées, séquences complémentaires  
20 spécifiques qui font office <sup>de séquences</sup> d'amorces de blocage. Ainsi on isole la ou les séquences d'intérêt qui va ou vont être amplifiées sélectivement. On obtient donc un seul amplicon pour chaque séquence d'intérêt pour laquelle aucune <sup>séquence</sup> amorce de blocage n'a été ajoutée.

23-05-2000

WO 99/61661

PCT/FR99/01247

3

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office <sup>de séquence</sup> d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification

Préférentiellement, la ou les <sup>séquences</sup> amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

Premièrement, dans le cas d'une <sup>séquence</sup> amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque <sup>séquence</sup> amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

Deuxièmement, dans le cas d'une <sup>séquence</sup> amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque <sup>séquence</sup> amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

Ainsi, l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

De plus, un autre élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

Chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué :

- soit par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique,

WO 99/61661

PCT/FR99/01247

4

- soit par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

Dans ce cas, l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

5 Selon un premier mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides  
10 modifiés, qui constituent cette boucle

Selon un second mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est constitué d'une " queue " de  
15 polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

Dans le cas d'une <sup>séquence</sup> ~~amorce~~ de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant un élément qui ne permet pas l'élongation, l'élément est substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou au groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

20 Dans le cas d'une <sup>séquence</sup> ~~amorce~~ de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant, en plus, un élément protecteur, l'élément est :

- substitué au phosphate placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5'  
25 de l'acide nucléique.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif.

La figure 1 représente une vue schématique de principe d'une amplification d'un  
30 brin d'acide nucléique et de son brin complémentaire par l'intermédiaire de deux amorces, dans ce cas qui est le plus simple, il y a une amorce par brin.

23-05-2000

WO 99/61661

PCT/FR99/01247

5

La figure 2 représente une vue schématique de principe d'une amplification selon la figure 1 mais utilisant la technique exposée par la présente invention.

La figure 3 représente les différentes substitutions qui peuvent être réalisées sur les nucléotides de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage où :

- 5 - R1 est un élément qui se trouve à l'extrémité 3' de l'amorce bloquante et qui empêche toute élongation lors de l'amplification,
- R2 est un élément qui peut se trouver sur au moins une des positions 2' du ribose d'un nucléotide de l'amorce bloquante et qui renforce la stabilité du duplex amorce bloquante - acide nucléique, et
- 10 - R3 est un élément qui se trouve à l'extrémité 5' de l'amorce bloquante et qui fait office d'élément protecteur.

La figure 4 représente le positionnement de l'élément R1 à l'extrémité 3' de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 5 représente le positionnement de l'élément R3 à l'extrémité 5' de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 6 représente le duplex <sup>séquence</sup> amorce de blocage - acide nucléique où X <sup>la séquence</sup> représente un nucléotide de l'amorce de blocage comportant l'élément R2 qui renforce la stabilité du duplex, en position sur le ribose de ce nucléotide.

La figure 7 représente différentes structures qui, par ajout en position 3' de l'amorce bloquante, empêche toute élongation lors de l'amplification.

La figure 8 représente différentes structures qui, par ajout en position 5' de l'amorce bloquante, en complément des modifications en position 3', telles que représentées à la figure 3, font office d'élément protecteur en empêchant la dégradation ou l'éjection de <sup>la séquence</sup> l'amorce de blocage lors de l'amplification.

La figure 9 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*1301 et HLA-DRB3\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

La figure 10 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-

23-05-2000

WO 99/61661

PCT/FR99/01247

8

région correspondant au site d'hybridation de l'amorce bloquante, rendant inefficace l'amplification correspondant à l'amorce non bloquante. Ce principe, illustré sur les figures 1, 2 et 13, concerne le fonctionnement des amorces bloquantes et des amorces non bloquantes.

5        Selon la figure 1, on réalise une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. De manière tout à fait classique, l'extension des amorces P1 et P2 s'opère et de multiples amplicons A sont obtenus.

      Selon la figure 2, on reprend exactement la figure 1, puisqu'il s'agit d'une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. Néanmoins sur le brin  
10 complémentaire et en aval de la progression de l'élongation de l'amorce P1, on ajoute une séquence, faisant office <sup>de séquence</sup> ~~d'amorce~~ de blocage P1b, qui est capable de s'hybrider sur le brin complémentaire, et d'empêcher l'amplification à son niveau. Dans ce cas de figure, il n'y aura aucun amplicon produit.

      Selon la figure 13, on reprend exactement les figures 1 et 2 puisqu'il s'agit d'une  
15 amplification sélective du gène G<sub>2</sub> par blocage des gènes apparentés G1 et G3 par des amorces bloquantes spécifiques et des amorces d'amplification non spécifiques.

      L'invention revendique l'utilisation <sup>de séquences</sup> ~~d'amorces~~ de blocage comprenant des nucléotides modifiés. Ce principe est illustré sur les figures 3 à 6.

20        Selon la figure 3, le nucléotide peut être modifié sur les positions 2' ou 3' du ribose, au niveau de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide et sur la position 5' du ribose au niveau de l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

      Selon la figure 4, le groupement R1 substitue, en position 3' du ribose, l'hydroxyle et permet d'empêcher l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce par la  
25 polymérase, lorsque le duplex acide nucléique - amorce bloquante est formé.

      Selon la figure 5, le groupement R3 substitue, en position 5' du ribose, le phosphate et permet de protéger l'amorce bloquante d'une dégradation de l'extrémité 5' et/ou d'un déplacement de l'amorce bloquante, lors de l'élongation de l'amorce d'amplification.

30        Selon la figure 6, le duplex acide nucléique - amorce bloquante peut être renforcé par substitution de l'hydroxyle ou de l'hydrogène en position 2' du ribose, cette

WO 99/61661

PCT/FR99/01247

22

Dans le tableau 5 qui suit, i représente l'inosine.

Référence bioMérieux	SEQ ID NO	Séquence nucléotidique (5' > 3')	Modif <sup>o</sup> en 5'	Modif <sup>o</sup> en 3'
5867	1	ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CG	-	-
P2	2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G	-	-
5858	3	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5967	4	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-acridine	-H
5965	5	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5816	6	CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5868	7	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5885	8	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT	-	-
5883	9	CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iia	-	-
5916	10	CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5917	11	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5021	12	CA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5870	13	CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5871	14	CA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5881	15	CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5902	16	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5903	17	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5913	18	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-
5914	19	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-

Tableau 5 : séquence nucléotidique des oligonucléotides utilisés comme  
amorces pour l'amplification

5

L'inosine, base non naturelle, est utilisée afin de fragiliser l'hybride acide  
nucléique - <sup>Séquence</sup>~~amorce~~ de blocage. En effet, l'inosine est relié à son nucléotide

WO 99/61661

23

PCT/FR99/01247

complémentaire par deux liaisons hydrogènes et donc lorsqu'on la substitue à une pyrimidine, la liaison entre les deux brins, à son niveau, est plus faible. Un gène pouvant varier d'autres gènes apparentés par une seule base, il est intéressant de substituer sur la séquence l'amorce de blocage, complémentaire du gène, les bases autour de cette position cruciale par des inosines. Le duplex acide nucléique - séquence - amorce de blocage devenant ainsi fragilisé, il ne peut y avoir hybridation que si l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence génique cible. On renforce ainsi la spécificité de l'amorce de blocage.

La présente invention concerne donc un procédé d'amplification sélective de gènes présents dans un mélange de gènes apparentés, par utilisation d'amorces oligonucléotidiques bloquantes correspondant à des oligonucléotides comportant une extrémité 3' modifiée ne permettant pas leur élongation lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles.

L'invention concerne également l'utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit dans la revendication 1, comportant une extrémité 5' modifiée ne permettant pas leur déplacement ou leur dégradation, lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles par une amorce spécifique d'une région située plus en 5' sur le même gène.

Dans le cas d'une utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit ci-dessus la modification à l'extrémité 5' est facultative. Ainsi, deux possibilités différentes existent.

Selon un premier mode d'utilisation, le groupement -OH en 3' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -H, -phosphate, -dabcyl, ou une chaîne carbonée terminée par un groupement -NH<sub>2</sub>, à titre d'exemples.

Selon un second mode d'utilisation, le groupement -phosphate en 5' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -DMT, acridine, -thiophosphate, ou une structure "tige-boucle", à titre d'exemples.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, peuvent aussi comporter des modifications de l'oligonucléotide en position non terminale et sont utilisées afin de favoriser leur hybridation sur leurs séquences cibles.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, ~~caractérisé en ce qu'il~~ consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce *de séquence* de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les amorcees *séquences* de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

3. Amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée par le fait que chaque amorcee *séquence* de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

4. Amorce, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que chaque amorcee *séquence* de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

5. Amorce, selon la revendication 4, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorcee *la séquence* de blocage et ne permet pas son élongation.



23-05-2000

6. Amorce, selon la revendication 5, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce *la séquence* de blocage et fait office d'élément protecteur.

7. Amorce, selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique.

8. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

9. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée par le fait que l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

10. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides modifiés, qui constituent cette boucle.

~~11. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est constitué d'une "queue" de polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.~~

~~12. Amorce dans laquelle l'élément ne permet pas l'élongation, selon l'une quelconque des revendications 4, 5 ou 7 à 11~~ 10, caractérisée par le fait que l'élément

23-05-2000

est substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou du groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

~~13~~ 12. Amorce dans laquelle l' un élément est protecteur, selon l'une quelconque des revendications 4, 6 à ~~12~~ 11 est présent, caractérisée par le fait que l'élément est :

- substitué au phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique.

09/701243

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

JC01 Rec'd PCT/PTO 27 NOV 2000

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR99/01247

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the amended pages and International Preliminary Examination Report of the international application No. PCT/FR99/01247 is a true and complete translation of the amended pages and International Preliminary Examination Report of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: 8 November 2000

Full name of the translator :

  
Elaine Patricia PARRISH

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,  
Gerrards Cross, Buckinghamshire,  
England.

23-05-2000

FR 009901247

- 2 -

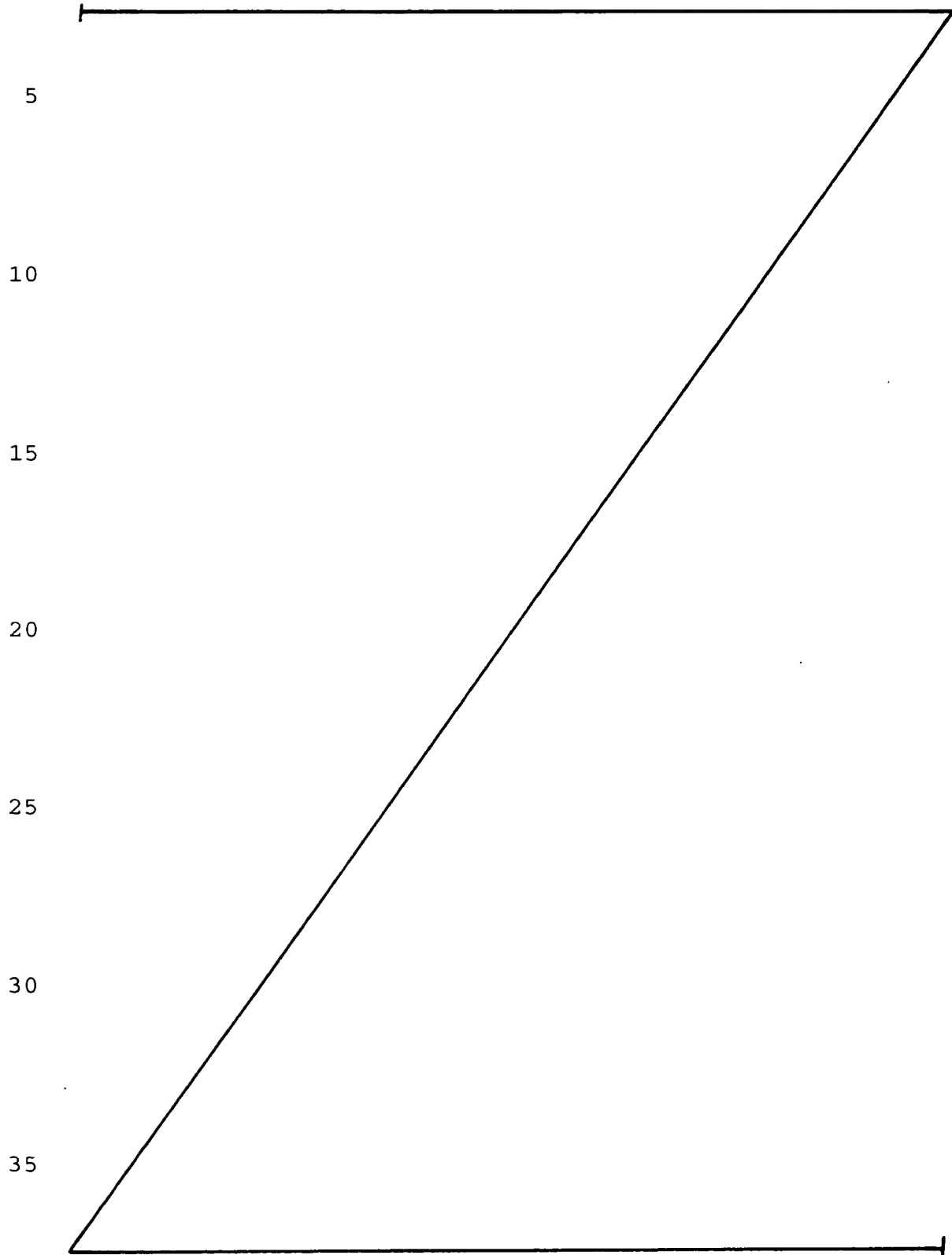
JC01 Rec'd PCT/PTO 27 NOV 2000

5 complementary primer which is just as specific to be  
produced. However, other problems may surface when  
choosing the sequence to be used for the hybridization  
10 of the primer. Specifically, the region which is really  
specific is sometimes unique and is located on the  
inner part of the sequence of interest. Choosing to  
hybridize a primer to such a region implies the  
production of only a varyingly significant fraction of  
15 said sequence of interest. There is therefore loss of  
information. In addition, the production of a primer  
specific for the nucleotide sequence of interest brings  
significantly more difficulty and work.

Document GB-A-2 293 328 proposes blocking  
sequences which are combined with primers which enable  
20 the amplification. There are two scenarios to be  
distinguished. Firstly, the blocking sequences are  
slightly different from the primers intended for the  
amplification. When they are used, there will be  
competition between these two types of primer in order  
25 to avoid poor pairings and nonspecific amplifications.  
Secondly, the primers for the amplification are  
upstream of the target sequence to be amplified, while  
the blocking sequences are different and are located  
downstream of said target sequence, such that the  
30 amplification product will be of known size, the  
blocking primer preventing the continuity of the  
elongation. In all cases, the blocking is produced via  
ddNTP in the 3' position.

Document WO-A-96/40992 describes an  
35 amplification method according to which masked primers  
are used which become functional when necessary. Such  
primers are, by way of example, obtained by blocking

*with the aid of a nucleotide, in particular in the form of a loop.*



5

10

15

With the present invention, the risks of obtaining truncated amplification products and the difficulties in obtaining primers specific for the nucleotide sequence to be amplified are eliminated, since it is possible to amplify specifically the nucleotide sequence of interest under conventional hybridization conditions.

To do this, two types of complementary primer are used; firstly, a type of primer which hybridizes indifferently to all related nucleotide sequences and, secondly, a type of primer or [sic] each primer hybridizes to only one of these related sequences. The first, which are nonspecific, will be used as primers for the elongation, the second, which are specific for nucleotide sequences related to the sequence of interest, will be used as sequences for blocking the elongation of some of these related nucleotide sequences.

When a mixture of nonspecific and specific primers is used, depending on the choice of the type of

specific sequence used, the elongation of certain nonspecific sequences can be prevented. It is then possible to select the amplicons which are obtained.

Thus, the amplification of certain related  
5 sequences whose amplification is not desired can be blocked by adding complementary sequences specific for these related sequences, these specific complementary sequences acting as blocking sequences. Thus, the sequence(s) of interest, which will be amplified  
10 selectively, is (are) isolated. A single amplicon is therefore obtained for each sequence of interest for which no blocking sequence has been added.

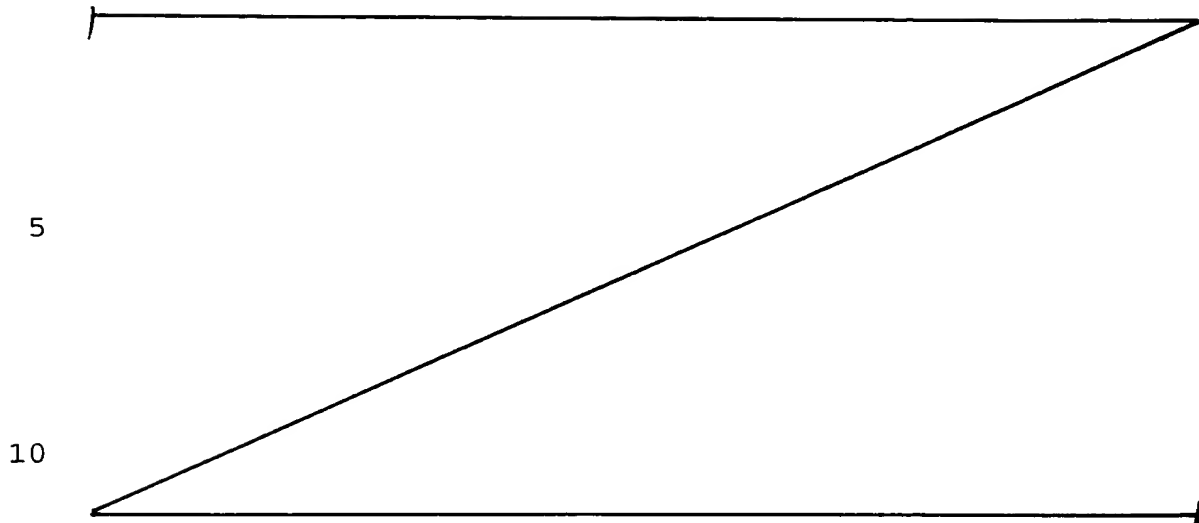
15

20

25

30

35



To this effect, the present invention relates to a method for amplifying at least one specific nucleotide sequence of a synthetic or natural nucleic acid contained in a reaction mixture, the reaction mixture consisting of at least one nucleic acid comprising at least two related nucleotide sequences and/or of at least two nucleic acids, each comprising at least one related nucleotide sequence, the method using at least one type of amplification primer capable of hybridizing with the nucleic acid so as to allow the amplification of the related nucleotide sequences, characterized in that it consists in adding, to the reaction mixture, at least one sequence, acting as a blocking sequence, which is capable:

- of hybridizing to at least one nucleotide sequence, which is not the specific nucleotide sequence(s) to be amplified, and
- of preventing, at the level of this sequence, the elongation of the amplification primer.

Preferably, the blocking sequence(s) is (are) capable of hybridizing to the, or to all the, nucleotide sequences which are not the specific nucleotide sequence(s) to be amplified.

Firstly, in the case of a blocking sequence used in an amplification method, as described above, each blocking sequence is an oligonucleotide based on



modified nucleotides and/or ribonucleotides and/or deoxyribonucleotides, such as PNAs or thiophosphate nucleotides.

Secondly, in the case of a blocking sequence  
5 used in an amplification method, as described above, each blocking sequence comprises at least one element which prevents the amplification.

Thus, the element which prevents the  
amplification is located at the 3' end of the blocking  
10 sequence and does not allow its elongation.

In addition, another element which prevents the amplification is located at the 5' end of the blocking sequence and acts as a protective element.

Each element which prevents the amplification  
15 consists:

- either of a nucleotide or modified nucleotide, or of an oligonucleotide which may or may not comprise at least one modified nucleotide, the nucleotide, modified nucleotide or oligonucleotide not hybridizing to the  
20 nucleic acid,
- or of a molecule other than a nucleotide or than a modified nucleotide.

In this case, the element consists of at least five, in particular at least ten, and preferably at  
25 least fifteen, nucleotides or modified nucleotides or a mixture of nucleotide(s) and modified nucleotide(s).

According to a first embodiment, and when the element consists of a nucleotide or modified nucleotide, or of an oligonucleotide which may or may  
30 not comprise at least one modified nucleotide, the nucleotide, modified nucleotide or oligonucleotide does not hybridize to the nucleic acid and the element is sufficiently long to allow the formation of a loop and of hybridization between the nucleotides and/or  
35 modified nucleotides which constitute this loop.

According to a second embodiment, and when the element consists of a nucleotide or modified

nucleotide, or of an oligonucleotide which may or may not comprise at least one modified nucleotide, the nucleotide, modified nucleotide or oligonucleotide does not hybridize to the nucleic acid and the element  
5 consists of a "tail" of polynucleotides and/or of modified polynucleotides, which comprises all the same bases.

In the case of a blocking sequence which is used in an amplification method, and which comprises an  
10 element which does not allow the elongation, the element is substituted for the hydrogen atom of the hydroxyl group or for the hydroxyl group, placed at the 3' position of the ribose, itself located at the 3' end of the nucleic acid.

15 In the case of a blocking sequence which is used in an amplification method, and which also comprises a protective element, the element is:

- substituted for the phosphate placed at the 5' position of the ribose, itself located at the 5' end of  
20 the nucleic acid, or
- grafted onto the phosphate placed at the 5' position of the ribose, itself located at the 5' end of the nucleic acid.

The attached figures are given by way of  
25 explanatory example and are not limiting in nature.

Figure 1 represents a schematic view of the principle of an amplification of a strand of nucleic acid and of its complementary strand, using two primers; in this case, which is the simplest, there is  
30 one primer per strand.

Figure 2 represents a schematic view of the principle of an amplification according to Figure 1, but using the technique set out by the present invention.

35 Figure 3 represents the various substitutions which can be carried out on the nucleotides of the blocking sequence, in which:

- R1 [sic] is an element which is at the 3' end of the blocking primer and which prevents any elongation during the amplification,

5 - R2 [sic] is an element which can be on at least one of the 2' positions of the ribose of a nucleotide of the blocking primer, and which reinforces the stability of the blocking primer/nucleic acid duplex, and

- R3 [sic] is an element which is at the 5' end of the blocking primer and which acts as a protective element.

10 Figure 4 represents the positioning of the R1 element at the 3' end of the blocking sequence when said primer is hybridized to the nucleic acid.

Figure 5 represents the positioning of the R3 element at the 5' end of the blocking sequence when  
15 said primer is hybridized to the nucleic acid.

Figure 6 represents the blocking sequence/nucleic acid duplex, in which X represents a nucleotide of the blocking sequence comprising, in position on the ribose of this nucleotide, the R2  
20 element which reinforces the stability of the duplex.

Figure 7 represents various structures which, by being added at the 3' position of the blocking primer, prevents [sic] any elongation during the amplification.

25 Figure 8 represents various structures which, by being added at the 5' position of the blocking primer, in addition to the modifications at the 3' position, as represented in Figure 3, act as a protective element by preventing the degradation or  
30 ejection of the blocking sequence during the amplification.

Figure 9 represents the electrophoregram corresponding to the result of the sequence reaction for a sample of DNA from an HLA-DRB1\*1301 and  
35 HLA-DRB3\*01 lymphoblastoid line, observed for the region encoding amino acids 56 to 65 (according to HLA

official nomenclature) of the HLA-DRB genes without using a blocking primer.

Figure 10 represents the electrophoregram corresponding to the result of the sequence reaction  
5 for a sample of DNA from an HLA-

10

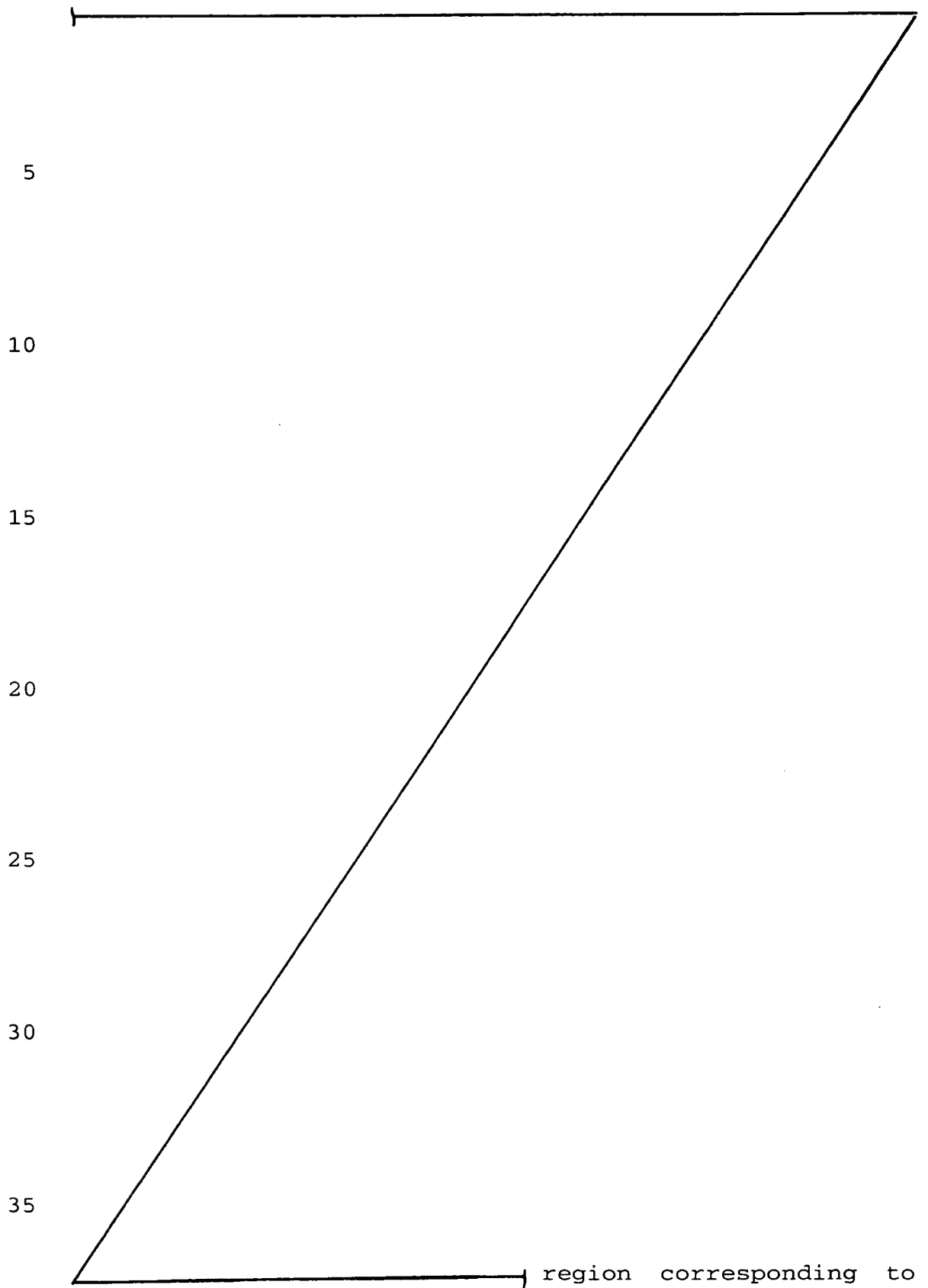
15

20

25

30

35



the hybridization site of the blocking primer, making the amplification corresponding to the nonblocking primer ineffective. This principle, illustrated in Figures 1, 2 and 13, concerns the functioning of the blocking primers and of the nonblocking primers.

According to Figure 1, an amplification is carried out with nonblocking primers P1 and P2. In an entirely conventional way, the extension of the P1 and P2 primers proceeds, and multiple amplicons A are obtained.

According to Figure 2, Figure 1 is repeated exactly, since it involves an amplification with nonblocking primers P1 and P2. However, on the complementary strand, and downstream of the progression of the P1 primer elongation, a sequence, acting as a blocking primer P1b, is added which is capable of hybridizing to the complementary strand and of preventing the amplification at the level of this strand. In this scenario, no amplicon will be produced.

According to Figure 13, Figures 1 and 2 are repeated exactly since it involves a selective amplification of the G<sub>2</sub> gene by blocking the related genes G1 [sic] and G3 [sic] using specific blocking primers and nonspecific amplification primers.

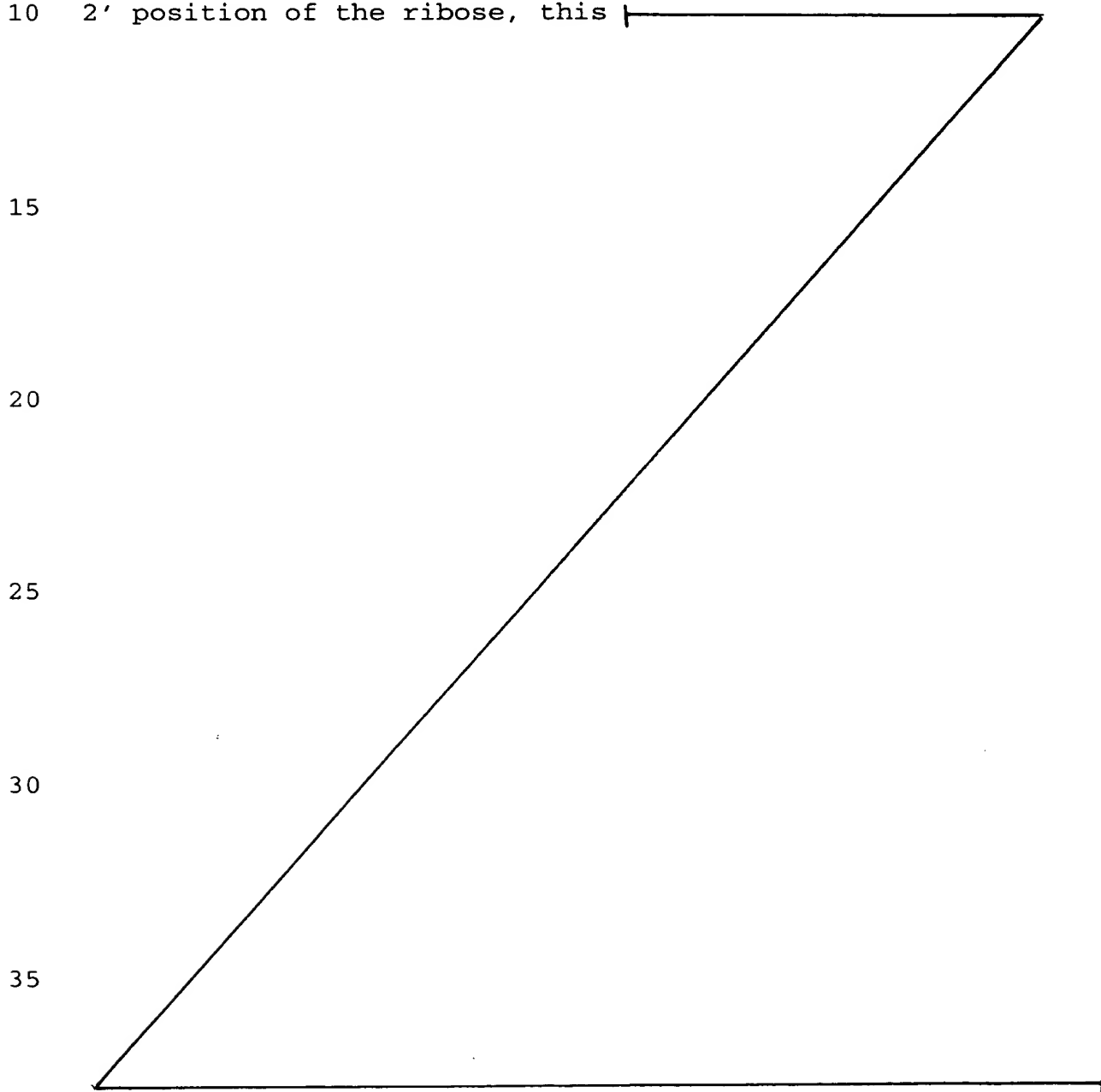
The invention claims the use of blocking primers comprising modified nucleotides. This principle is illustrated in Figures 3 to 6.

According to Figure 3, the nucleotide can be modified on the 2' or 3' positions of the ribose at the 3' end of the oligonucleotide, and on the 5' position of the ribose at the 5' end of said oligonucleotide.

According to Figure 4, the R1 group replaces, at the 3' position of the ribose, the hydroxyl and makes it possible to prevent the elongation of the 3' end of the primer by the polymerase, when the nucleic acid/blocking primer duplex is formed.

According to Figure 5, the R3 group replaces, at the 5' position of the ribose, the phosphate and makes it possible to protect the blocking primer against degradation of the 5' end and/or against being  
5 displaced, during the elongation of the amplification primer.

According to Figure 6, the nucleic acid/blocking primer duplex can be reinforced by substitution of the hydroxyl or of the hydrogen at the  
10 2' position of the ribose, this



5

10

In Table 5 below, i represents inosine.

bioMérieux reference	SEQ ID NO	Nucleotide sequence (5' > 3')	5' Modif.	3' Modif.
5867	1	ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CG	-	-
P2	2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G	-	-
5858	3	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5967	4	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-acridine	-H
5965	5	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	..C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5816	6	CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5868	7	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5885	8	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT	-	-
5883	9	CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iiA	-	-
5916	10	CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5917	11	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5021	12	CA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5870	13	CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5871	14	CA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5881	15	CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5902	16	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5903	17	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5913	18	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-
5914	19	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-

Table 5: Nucleotide sequence of the oligonucleotides  
used as primers for the amplification

15



Inosine, which is not a natural base, is used in order to weaken the nucleic acid/blocking sequence hybrid. Specifically, inosine is linked to its complementary nucleotide via two hydrogen bonds, and therefore, when it is substituted for a pyrimidine, the bonding between the two strands, in its region, is weaker. Since a gene can differ from other related genes by a single base, it is advantageous to substitute, on the blocking sequence, which is complementary to the gene, the bases around this essential position with inosines. Since the nucleic acid/blocking sequence duplex thus becomes weakened, hybridization can only occur if the primer is perfectly complementary to the target gene sequence. The specificity of the blocking sequence is thus reinforced.

The present invention therefore relates to a method for selectively amplifying genes present in a mixture of related genes, using blocking oligonucleotide primers which correspond to oligonucleotides comprising a modified 3' end which does not allow their elongation during the steps for enzymatically amplifying target genes.

The invention also relates to the use of primers which block in the sense described in claim 1, and which comprise a modified 5' end which does not allow their displacement or their degradation, in the steps for enzymatically amplifying target genes using a primer specific for a region which is located further toward the 5' end on the same gene.

In the case of use of primers which block in the sense described above, the modification at the 5' end is facultative. Thus, two different possibilities exist.

According to a first embodiment, the 3' -OH group is replaced with a group which is not naturally found in nature, such as an -H, -phosphate, or -dabcyl

group, or a carbon-based chain terminated by an  $\text{-NH}_2$  group, by way of examples.

According to a second embodiment, the 5' -phosphate group is replaced with a group which is not naturally found in nature, such as a -DMT, acridine or -thiophosphate group, or a "stem-loop" structure, by way of examples.

The blocking primers, as described above, can also comprise modifications of the oligonucleotide in a nonterminal position, and are used in order to promote their hybridization to their target sequences.

15

20

25

30

35

**CLAIMS**

1. Method for amplifying at least one specific nucleotide sequence of a synthetic or natural nucleic acid contained in a reaction mixture, the reaction  
5 mixture consisting of at least one nucleic acid comprising at least two related nucleotide sequences and/or of at least two nucleic acids, each comprising at least one related nucleotide sequence, the method using at least one type of amplification primer capable  
10 of hybridizing with the nucleic acid so as to allow the amplification of the related nucleotide sequences, consists in adding, to the reaction mixture, at least one sequence, acting as a blocking sequence, which is capable:

15 - of hybridizing to at least one nucleotide sequence, which is not the specific nucleotide sequence(s) to be amplified, and

- of preventing, at the level of this nucleotide sequence, the elongation of the amplification primer.

20 2. Method according to claim 1, characterized in that the blocking sequence(s) is (are) capable of hybridizing to the, or to all the, nucleotide sequences which are not the specific nucleotide sequence(s) to be amplified.

25 3. Blocking primer used in an amplification method according to either of claims 1 and 2, characterized in that each blocking sequence is an oligonucleotide based on modified nucleotides and/or ribonucleotides and/or deoxyribonucleotides, such as PNAs or thiophosphate  
30 nucleotides.

4. Primer according to claim 3, characterized in that each blocking sequence comprises at least one element which prevents the amplification.

35 5. Primer according to claim 4, characterized in that the element which prevents the amplification is located at the 3' end of the blocking sequence and does not allow its elongation.

6. Primer according to claim 5, characterized in that the element which prevents the amplification is located at the 5' end of the blocking sequence and acts as a protective element.

5 7. Primer according to one of claims 4 to 6, characterized in that each element which prevents the amplification consists of a nucleotide or modified nucleotide, or of an oligonucleotide which may or may not comprise at least one modified nucleotide, the  
10 nucleotide, modified nucleotide or oligonucleotide not hybridizing to the nucleic acid.

8. Primer according to any one of claims 4 to 6, characterized in that each element which prevents the amplification consists of a molecule other than a  
15 nucleotide or than a modified nucleotide.

9. Primer according to any one of claims 4 to 7, characterized in that the element consists of at least five, in particular at least ten, and preferably at least fifteen, nucleotides or modified nucleotides or a  
20 mixture of nucleotide(s) and modified nucleotide(s).

10. Primer according to any one of claims 4 to 7 or 9, characterized in that the element is sufficiently long to allow the formation of a loop and of hybridization between the nucleotides and/or modified  
25 nucleotides which constitute this loop.

11. Primer in which the element does not allow the elongation, according to any one of claims 4, 5 or 7 to 10, characterized in that the element is substituted for the hydrogen atom of the hydroxyl group or of [sic]  
30 the hydroxyl group, placed at the 3' position of the ribose, itself located at the 3' end of the nucleic acid.

12. Primer in which a protective element according to any one of claims 4, 6 to 11 is present,  
35 characterized in that the element is:

- substituted for the phosphate placed at the 5' position of the ribose, itself located at the 5' end of the nucleic acid, or
- grafted onto the phosphate placed at the 5' position  
5 of the ribose, itself located at the 5' end of the nucleic acid.

10

15

20

25

30

35

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MD/B05B3145	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01247	International filing date (day/month/year) 27 May 1999 (27.05.99)	Priority date (day/month/year) 27 May 1998 (27.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant BIO MERIEUX		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 11 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 September 1999 (27.09.99)	Date of completion of this report 25 August 2000 (25.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01247

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1, 6, 7, 9-21, 24, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages 2, 2a, 3-5, 8, 22, 23, filed with the letter of 23 May 2000 (23.05.2000),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-12, filed with the letter of 23 May 2000 (23.05.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☒ the claims, Nos. 13

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-2	YES
	Claims	3-12	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-2	YES
	Claims	3-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following documents:

- D1: GB-A-2 293 238 (INCELTEC LTD; WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 March 1996 (1996-03-20);
- D2: WO-A-96/40992 (ABBOTT LAB) 19 December 1996 (1996-12-19);
- D3: WO-A-94/03630 (BECKMAN INSTRUMENTS INC.; ADAMS CRAIG W. (US); DANIELS DAVID W. (US)) 17 February 1994 (1994-02-17).

1. Documents WO-A-98/28443 and BI and STAMBROOK, Nucleic Acids Research, Vol.26, No.12, 1998, cited as "P, X" documents in the international search report do not form part of the prior art, since the priority of the present application appears to be valid (PCT Rule 64.1). Document WO-A-98/28443 could, however, form part of the prior art in a national or regional phase (for example at the EPO).
2. The amplification method of Claims 1 and 2 is novel (PCT Article 33(2)), since the prior art does not disclose any method using specific blocking sequences for nucleotide sequences related to the particular sequence to be amplified. On page 11, D1



describes a method using primers which compete with the specific primers of the sequence to be amplified. These blocking primers are modified so as to prevent their elongation. The method of D1 therefore improves amplification specificity by means of competition between primers. In the present invention, a single primer, which is not completely specific to the target sequence, can be used to obtain a specific amplification by blocking the amplification of the related sequences with blocking sequences specific to portions characteristic of these related sequences. The prior art does not provide any indication that amplification specificity of a target sequence can be increased relative to the related sequences by using blocking sequences during amplification. For that reason, the subject matter of Claims 1 and 2 involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

3. Claim 3 and dependent Claims 4 to 12 must be interpreted as referring to a product, i.e. an oligonucleotide which can be used *inter alia* to block an amplification process according to Claims 1 and 2 (PCT Examination Guidelines, PCT/GL/III, 4.8). The subject matter of Claim 3 is therefore characterized only by the fact that the product is an oligonucleotide containing deoxyribonucleotides. The subject matter of Claim 3 is not therefore novel (PCT Article 33(2)), since D1 for example (page 16, line 4) discloses an oligonucleotide.
4. The subject matter of Claims 4 and 5 is not novel (PCT Article 33(2)) since the oligonucleotides of D1 (page 11, last line) and D3 (page 48, line 25 and page 49, line 13) comprise an element (ddNTP)

located at the 3' end, which prevents amplification.

5. The subject matter of Claim 6 is not novel (PCT Article 33(2)), since on page 11, D2 discloses an oligonucleotide which comprises at its 5' end a protective stem-loop sequence. D2 also describes a technique for protecting the 5' end of a primer by inserting "bulky" molecules at the 5' end.
6. The subject matter of Claims 7 and 10 is not novel (PCT Article 33(2)), since D2 (middle of page 11) discloses oligonucleotides (stem-loops) which hybridize to the primers to prevent amplification.
7. The subject matter of Claim 8 is not novel (PCT Article 33(2)), since D3 (middle of page 13) discloses oligonucleotides comprising molecules such as digoxin and biotin, which differ from a nucleotide. These oligonucleotides prevent amplification by hybridizing to the primer.
8. The subject matter of Claim 9 is not novel (PCT Article 33(2)), since D1 (page 26, line 5) discloses an oligonucleotide blocking non-specific amplification. This oligonucleotide consists of 21 nucleotides and contains a 3' ddNTP.
9. The subject matter of Claim 11 is not novel (PCT Article 33(2)), since D3 discloses on page 93, lines 1 to 3, a blocking oligonucleotide terminated at the 3' end by dideoxy-GTP, i.e. a nucleotide in which the ribose 3' -OH grouping is replaced with an -H.
10. The subject matter of Claim 12 is not novel (PCT Article 33(2)), since the elements providing

protection against the activity of exonucleases such as thiophosphate or a loop located at the 5' position of the ribose on the 5' side of the nucleotide are well known to a person skilled in the art.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR99/01247

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 98 28443	02 July 1998 (02.07.1998)	17 December 1997 (17.12.1997)	20 December 1996 (20.12.1996) 06 November 1997 (06.11.1997)

See the Supplemental Box.

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/ 99/01247

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

The following document, published (PCT Rule 70.10) after the priority date of the present application, is not considered to form part of the prior art in this preliminary examination but could play a role in the examination of novelty in a regional or national phase.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In Claim 12, it is unclear whether the primer of that claim or the protective element is derived from Claims 4, 6 and 12. The protective element does not form part of the subject matter of Claim 4. Claim 12 is therefore unclear (PCT Article 6).

PC

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) MD/B05B3145

**Box No. I TITLE OF INVENTION**

METHOD FOR AMPLIFYING AT LEAST ONE SPECIFIC NUCLEOTIDE SEQUENCE, AND PRIMERS USED

**Box No. II APPLICANT**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIO MERIEUX  
Chemin de l'Orme  
69280 MARCY L'ETOILE  
FRANCE

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant  
for the purposes of:

☐

all designated States

☒

all designated States except the United States of America

☐

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MOUGIN Bruno  
29 rue Lamartine  
69003 LYON  
FRANCE

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant  
for the purposes of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.
**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CABINET GERMAIN & MAUREAU  
BP 6153  
69466 LYON CEDEC 06  
FRANCE

Telephone No.

04 72 69 84 30

Facsimile No.

04 72 69 84 31

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>LAAYOUN Ali Triangle Fleuri 1 rue du Rhone 69007 LYON FRANCE</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: FRANCE	State <i>(that is, country)</i> of residence: FRANCE
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p><input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>	



**Box No. V DESIGNATION STATES (Double-click here if you want all boxes on this page checked.)**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line) .....

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates .....                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DZ</b> Algeria .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AG</b> Antigua and Barbuda .....                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Morocco .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina .....                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia .....                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria .....                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation .....                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> United Republic of Tanzania .....                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America .....                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India .....                                 |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland .....                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya .....                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea ..... | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe .....   |
|   | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea .....                     | <input checked="" type="checkbox"/> .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> .....  |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

**Box No. VI PRIORITY CLAIM**
☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 27 May 1998	98 06866	FRANCE		
item (2)				
item (3)				

- ☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

**Choice of International Searching Authority (ISA)**  
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EP

**Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):**

Date (day/month/year)	Number	Country (or regional Office)
8 February 1999	FA 559262	FRANCE

**Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING**

This international application contains the following number of sheets:

request :4

description (excluding sequence listing part) :24

claims :3

abstract :1

drawings :7

sequence listing part of description :9

**Total number of sheets** :48

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- ☐ fee calculation sheet
- ☐ separate signed power of attorney
- ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:
- ☐ statement explaining lack of signature
- ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- ☐ translation of international application into (language):
- ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- ☒ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- ☒ other (specify): copy of the Search Report, 2 tax receipts and 2 checks

**Figure of the drawings** which should accompany the abstract:

**Language of filing of the international application:** French

**Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

CABINET GERMAIN & MAUREAU  
Mireille DIDIER LYON, 27 May 1999  
CPI 971202

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:  <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PCT

## REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réception à l'office récepteur

PCT / FR 99 / 01 247

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) MD/B05B3145

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière et amorces de mise en oeuvre

## Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BIO MERIEUX  
Chemin de l'Orme  
69280 MARCY L'ETOILE  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est  
déposant pour :

☐tous les États  
désignés☒tous les États désignés sauf  
les États-Unis d'Amérique☐les États-Unis d'Amérique  
seulement☐les États indiqués dans  
le cadre supplémentaire

## Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

MOUGIN Bruno  
29 rue Lamartine  
69003 LYON  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée,  
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est  
déposant pour :

☐tous les États  
désignés☐tous les États désignés sauf  
les États-Unis d'Amérique☒les États-Unis d'Amérique  
seulement☐les États indiqués dans  
le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

## Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/ a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒

mandataire

☐

représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

CABINET GERMAIN & MAUREAU  
BP 6153  
69466 LYON CEDEX 06  
FRANCE

n° de téléphone

04 72 69 84 30

n° de télécopieur

04 72 69 84 31

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

## \*Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

*Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

LAAYOUN Ali  
Triangle Fleuri  
1 rue du Rhône  
69007 LYON  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

**Brevet régional**

- ☒ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) . . . . .

**Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):**

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Arménie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Autriche . . . . .                                   | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg . . . . .                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie . . . . .                                  | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> MD République de Moldova . . . . .                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine . . . . .                         | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar . . . . .                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine . . . . . |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie . . . . .                                   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil . . . . .                                     | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Bélarus . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada . . . . .                                     | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein . . . . .              | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine . . . . .                                      | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande . . . . .                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba . . . . .                                       | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque . . . . .                         | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Allemagne . . . . .                                  | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Danemark . . . . .                                   | <input checked="" type="checkbox"/> RU Fédération de Russie . . . . .                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> SD Soudan . . . . .                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Espagne . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> SE Suède . . . . .                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finlande . . . . .                                   | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour . . . . .                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Royaume-Uni . . . . .                                | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenade . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie . . . . .                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone . . . . .                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana . . . . .                                      | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadjikistan . . . . .                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambie . . . . .                                     | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkménistan . . . . .                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago . . . . .                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie . . . . .                                  | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël . . . . .                                     | <input checked="" type="checkbox"/> UG Ouganda . . . . .                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Inde . . . . .                                       | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique . . . . .                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande . . . . .                                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon . . . . .                                      | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan . . . . .                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya . . . . .                                      | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirghizistan . . . . .                               | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie . . . . .                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée . . . . . | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe . . . . .                              |
|   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR République de Corée . . . . .                        | Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national)                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan . . . . .                                 | d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie . . . . .                               | présente feuille :   |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka . . . . .                                  | <input checked="" type="checkbox"/> AE Emirats Arabes Unis . . . . .                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Libéria . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud . . . . .                        |
|   | <input type="checkbox"/> . . . . .   |

**Déclaration concernant les désignations de précaution :** outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDECA DE PRIORITÉ		D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 27 Mai 1998	98 06866	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : (1)

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

**Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE**

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 8 Février 99 FA 559262 FRANCE		
---	---	--	--

**Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT**

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :
requête : 4	1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes
description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 24	2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé
revendications : 3	3. <input checked="" type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant :
abrégé : 1	4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature
dessins : 7	5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
partie de la description réservée au listage des séquences : 9	6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) :
Nombre total de feuilles : 48	7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
	8. <input checked="" type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur copie du Rapport de Recherche
	9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : 2 bordereaux de taxes + 2 Chèques

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé : Langue de dépôt de la demande internationale : Français

**Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE**

A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

CABINET GERMAIN & MAUREAU  
Mireille DIDIER  
CPI 971202

LYON, le 27 Mai 1999

Réservé à l'office récepteur		2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 27 MAI 1999		
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :		
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :		
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.	

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

Formulaire PCT/RO/101 (dernière feuille) (juillet 1998; réimpression janvier 1999) Voir les notes relatives au formulaire de requête



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/61661</b> (43) Date de publication internationale: 2 décembre 1999 (02.12.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01247</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 mai 1999 (27.05.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/06866 27 mai 1998 (27.05.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MOUGIN, Bruno [FR/FR]; 29, rue Lamartine, F-69003 Lyon (FR). LAAY-OUN, Ali [FR/FR]; Triangle Fleuri, 1, rue du Rhône, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET GERMAIN &amp; MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: <u>METHOD FOR AMPLIFYING AT LEAST A PARTICULAR NUCLEOTIDE SEQUENCE AND PRIMERS USED</u></p>		
<p>(54) Titre: <u>PROCEDE D'AMPLIFICATION D'AU MOINS UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE PARTICULIERE ET AMORCES DE MISE EN OEUVRE</u></p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>The invention concerns a method for amplifying at least a particular nucleotide sequence of a synthetic or natural nucleic acid contained in a reaction mixture, the reaction mixture consisting of at least a nucleic acid comprising at least two related nucleotide sequences and/or at least two nucleic acids each comprising at least a related nucleotide sequence; the method uses amplifying primers capable of hybridising with the nucleic acid for amplifying related nucleotide sequences. The invention also concerns primers for implementing such a method. Said method consists in adding, in the reaction mixture, at least a sequence acting as blocking primer capable of: hybridising with at least a nucleotide sequence, which is not the particular nucleotide sequence or sequences to be amplified; preventing at its level the elongation of the amplifying primer. The invention is particularly applicable in the field of techniques for amplifying related genes.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée; le procédé utilisant des amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées. L'invention concerne également des amorces permettant la mise en oeuvre d'un tel procédé. Ce procédé consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable: de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine des techniques d'amplification de gènes apparentés.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						



**Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière et amorces de mise en œuvre**

La présente invention concerne un nouveau procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel  
5 contenu dans un mélange réactionnel. Elle concerne également des amorces permettant une telle amplification.

*L'état de la technique décrit des méthodes permettant d'amplifier des séquences nucléotidiques utilisant des amorces spécifiques de ces séquences à amplifier. Ainsi on peut amplifier un gène ou une famille de gènes au sein d'une préparation d'acides  
10 nucléiques. De nombreuses techniques utilisent des oligonucléotides complémentaires de la séquence cible servant d'amorces pour l'élongation par une polymérase.*

*Pour l'amplification des ADN, il existe la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-  
15 A-0.201.184, ou la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069.*

*Pour l'amplification des ARN, plusieurs techniques ont aussi été décrites dans différents documents. Ces techniques sont les suivantes :*

- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-  
20 90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,
- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5,194,370, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

25 Cependant, ces techniques imposent un choix rigoureux des amorces d'amplification. En effet, des amorces peu spécifiques de la séquence d'intérêt vont permettre l'amplification de nombreuses séquences apparentées sur lesquelles elles se seront fixées. L'amplicon correspondant à la séquence d'intérêt se retrouvera donc dilué dans un mélange d'amplicons, ce qui ne facilitera pas l'utilisation de ce produit  
30 d'amplification. Dans ces conditions, s'impose alors le choix rigoureux d'une région de la séquence nucléotidique qui soit suffisamment spécifique pour permettre de produire

une amorce complémentaire tout aussi spécifique. Toutefois, d'autres problèmes peuvent apparaître lors du choix de la séquence à utiliser pour l'hybridation de l'amorce. En effet, il arrive que la région réellement spécifique soit unique et se trouve à l'intérieur de la séquence d'intérêt. Le choix d'hybrider une amorce au niveau d'une telle région  
5 implique de n'obtenir qu'une fraction plus ou moins importante de ladite séquence d'intérêt. On a donc une perte d'information. De plus, l'obtention d'une amorce spécifique de la séquence nucléotidique d'intérêt apporte un surcroît important de difficulté et de travail.

10 Avec la présente invention, on s'affranchit des risques d'obtention de produits d'amplification tronqués et des difficultés à obtenir des amorces spécifiques de la séquence nucléotidique à amplifier, puisqu'il est possible d'amplifier spécifiquement la séquence nucléotidique d'intérêt dans des conditions d'hybridation classiques.

Pour ce faire, on utilise deux types d'amorces complémentaires, d'une part, un  
15 type d'amorces qui s'hybride indifféremment sur toutes les séquences nucléotidiques apparentées et, d'autre part, un type d'amorces où chaque amorce s'hybride sur une seule de ces séquences apparentées. Les premières, qui sont non-spécifiques, vont servir d'amorces pour l'élongation, les secondes, spécifiques de séquences nucléotidiques apparentées à la séquence d'intérêt, vont servir d'amorces de blocage de l'élongation de  
20 certaines de ces séquences nucléotidiques apparentées.

Dans le cas où on utilise un mélange d'amorces non spécifiques et spécifiques, selon le choix du type de séquences spécifiques utilisées, on peut empêcher l'élongation de certaines séquences non spécifiques. Il est alors possible de sélectionner les amplicons  
25 que l'on obtient.

Ainsi, on peut bloquer l'amplification de certaines séquences apparentées que l'on ne souhaite pas amplifier, par l'intermédiaire d'un ajout de séquences complémentaires, spécifiques de ces séquences apparentées, séquences complémentaires  
— spécifiques qui font office d'amorces de blocage. Ainsi on isole la ou les séquences —  
30 d'intérêt qui va ou vont être amplifiées sélectivement. On obtient donc un seul amplicon pour chaque séquence d'intérêt pour laquelle aucune amorce de blocage n'a été ajoutée.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

Préférentiellement, la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

Premièrement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

Deuxièmement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

Ainsi, l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

De plus, un autre élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

Chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué :

- soit par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique,

- soit par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

Dans ce cas, l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

5        Selon un premier mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides  
10        modifiés, qui constituent cette boucle

      Selon un second mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est constitué d'une " queue " de  
15        polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

      Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant un élément qui ne permet pas l'élongation, l'élément est substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou au groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

20        Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant, en plus, un élément protecteur, l'élément est :

- substitué au phosphate placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou  
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5'  
25        de l'acide nucléique.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif.

La figure 1 représente une vue schématique de principe d'une amplification d'un  
30        brin d'acide nucléique et de son brin complémentaire par l'intermédiaire de deux amorces, dans ce cas qui est le plus simple, il y a une amorce par brin.

La figure 2 représente une vue schématique de principe d'une amplification selon la figure 1 mais utilisant la technique exposée par la présente invention.

La figure 3 représente les différentes substitutions qui peuvent être réalisées sur les nucléotides de l'amorce de blocage où :

- 5 - R1 est un élément qui se trouve à l'extrémité 3' de l'amorce bloquante et qui empêche toute élongation lors de l'amplification,
- R2 est un élément qui peut se trouver sur au moins une des positions 2' du ribose d'un nucléotide de l'amorce bloquante et qui renforce la stabilité du duplex amorce bloquante - acide nucléique, et
- 10 - R3 est un élément qui se trouve à l'extrémité 5' de l'amorce bloquante et qui fait office d'élément protecteur.

La figure 4 représente le positionnement de l'élément R1 à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

15 La figure 5 représente le positionnement de l'élément R3 à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 6 représente le duplex amorce de blocage - acide nucléique où X représente un nucléotide de l'amorce de blocage comportant l'élément R2 qui renforce la stabilité du duplex, en position sur le ribose de ce nucléotide.

20 La figure 7 représente différentes structures qui, par ajout en position 3' de l'amorce bloquante, empêche toute élongation lors de l'amplification.

La figure 8 représente différentes structures qui, par ajout en position 5' de l'amorce bloquante, en complément des modifications en position 3', telles que représentées à la figure 3, font office d'élément protecteur en empêchant la dégradation ou l'éjection de l'amorce de blocage lors de l'amplification.

25 La figure 9 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*1301 et HLA-DRB3\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

30 La figure 10 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-

DRB1\*1301 et HLA-DRB3\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-phosphate / 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> inhibant l'amplification du gène HLA-DRB3.

5           La figure 11 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*0901 et HLA-DRB4\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

10           La figure 12 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*0901 et HLA-DRB4\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H inhibant l'amplification du gène HLA-DRB4.

15           La figure 13 représente une vue schématique de principe d'une amplification sélective d'un gène dans une famille de gènes apparentés localisé sur un même chromosome.

20           La présente invention concerne donc, entre autre, l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques modifiées en leurs extrémités, pour l'amplification sélective de gènes.

          L'invention concerne également une méthode utilisant des amorces oligonucléotidiques modifiées, pour l'amplification sélective de certains gènes présents dans un ensemble de gènes apparentés.

25           L'analyse de gènes d'intérêt est facilitée par l'utilisation de techniques d'amplification génique, qui permettent de préparer à partir d'un échantillon biologique, des quantités de matériel spécifique aisément analysable avec les techniques classiques de biologie moléculaire. Ainsi, l'emploi d'amorces oligonucléotidiques, bornant une  
30           région génique, conduit à l'obtention d'un mélange de molécules nucléotidiques considérablement enrichi en la molécule d'intérêt, qui devient alors facilement détectable

par des techniques d'analyse électrophorétique ou des techniques d'hybridation moléculaire. L'efficacité de cette approche réside dans l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des régions géniques à analyser. Ces amorces doivent donc être des séquences oligonucléotidiques capables de s'hybrider sélectivement avec  
5 les séquences nucléiques d'intérêt, présentes dans l'échantillon.

L'analyse de gènes membres de familles de gènes structurellement proches, peut cependant être parfois délicate. La recherche de régions nucléotidiques uniques pour un gène donné permet d'atteindre la spécificité recherchée, mais cette approche peut parfois  
10 s'avérer être difficile voire impossible.

La présente invention consiste donc à combiner l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques pour l'amplification d'un ensemble limité de gènes structurellement proches, et d'amorces oligonucléotidiques modifiées capables de  
15 bloquer spécifiquement les gènes indésirables. En fait, à chaque type de ces amorces modifiés correspond un seul type de gène indésirable.

Cette stratégie permet de simplifier l'analyse de gènes en mélange, par détermination de leur séquence nucléotidique (par séquençage en gel par exemple ou par séquençage par hybridation multiple - DNA Chip -) ou par l'analyse de mutations.

20

L'invention revendique l'utilisation de mélanges d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification effective de régions nucléiques correspondantes, et d'amorces nucléotidiques bloquantes, chevauchantes ou situées en aval (par rapport à l'amorce nucléotidique permettant l'amplification), constituées d'oligonucléotides ne pouvant  
25 servir de séquences initiatrices pour l'élongation et donc pour l'amplification des séquences en aval.

Ainsi, pour un gène ou un allèle indésirable, l'amorce non bloquante et l'amorce bloquante s'hybrident sur le même brin pour une polarité d'amorce-donnée-(amorces 5'  
30 en amont, ou amorces 3' en aval de la région à analyser). L'amorce non bloquante, si elle parvient à s'hybrider sur le brin à amplifier, ne peut générer des amplicons au-delà de la

région correspondant au site d'hybridation de l'amorce bloquante, rendant inefficace l'amplification correspondant à l'amorce non bloquante. Ce principe, illustré sur les figures 1, 2 et 13, concerne le fonctionnement des amorces bloquantes et des amorces non bloquantes.

5            Selon la figure 1, on réalise une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. De manière tout à fait classique, l'extension des amorces P1 et P2 s'opère et de multiples amplicons A sont obtenus.

             Selon la figure 2, on reprend exactement la figure 1, puisqu'il s'agit d'une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. Néanmoins sur le brin  
10 complémentaire et en aval de la progression de l'élongation de l'amorce P1, on ajoute une séquence, faisant office d'amorce de blocage P1b, qui est capable de s'hybrider sur le brin complémentaire, et d'empêcher l'amplification à son niveau. Dans ce cas de figure, il n'y aura aucun amplicon produit.

             Selon la figure 13, on reprend exactement les figures 1 et 2 puisqu'il s'agit d'une  
15 amplification sélective du gène G<sub>2</sub> par blocage des gènes apparentés G1 et G3 par des amorces bloquantes spécifiques et des amorces d'amplification non spécifiques.

L'invention revendique l'utilisation d'amorces de blocage comprenant des nucléotides modifiés. Ce principe est illustré sur les figures 3 à 6.

20            Selon la figure 3, le nucléotide peut être modifié sur les positions 2' ou 3' du ribose, au niveau de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide et sur la position 5' du ribose au niveau de l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

             Selon la figure 4, le groupement R1 substitue, en position 3' du ribose, l'hydroxyle et permet d'empêcher l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce par la  
25 polymérase, lorsque le duplex acide nucléique - amorce bloquante est formé.

             Selon la figure 5, le groupement R3 substitue, en position 5' du ribose, le phosphate et permet de protéger l'amorce bloquante d'une dégradation de l'extrémité 5' et/ou d'un déplacement de l'amorce bloquante, lors de l'élongation de l'amorce  
d'amplification.

30            Selon la figure 6, le duplex acide nucléique - amorce bloquante peut être renforcé par substitution de l'hydroxyle ou de l'hydrogène en position 2' du ribose, cette



substitution pouvant se faire sur plusieurs nucléotides de l'amorce bloquante. Le groupement R2 peut être, par exemple, un radical 2' O-méthyle, qui stabilise les duplex ADN - ARN, en créant une interaction de type hydrophobe.

5           La stratégie revendiquée trouve de multiples applications chaque fois qu'un mélange de séquences apparentées est à analyser : génétique humaine ou animale, analyses d'agents infectieux (virus, bactéries, parasites,...)

A titre d'exemple, des applications dans le domaine du typage HLA (pour Human Leukocyte Antigens) sont décrites ci-après.

10           Ainsi, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comprend un ensemble de gènes situés sur le chromosome 6 chez l'homme, impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Bodmer et al. *Nomenclature for factors of the HLA system*, 1996, Tissue Antigens, 1997, 49, 297-321). Un très grand polymorphisme est observé pour ces gènes, et un jeu bien particulier de versions (ou allèles) de chacun de ces gènes est  
15 observé pour chaque individu. Il est important de noter que tout individu possède deux allèles de chaque gène, hérités l'un de la mère, l'autre du père.

Au sein de cet ensemble de gènes du CMH plus couramment nommés "gènes HLA", certains sont désormais bien connus, tant leur séquence nucléique que les fonctions des protéines correspondantes. Il s'agit essentiellement des gènes HLA dits de  
20 classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw) et des gènes HLA dits de classe II (HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP). Ces gènes participent à la régulation de la réponse immunitaire au niveau de la surveillance de l'intégrité du soi, avec différentes conséquences dans le domaine médical. Une première application concerne le domaine des greffes d'organes ou de moelle osseuse, et de nombreux travaux ont démontré l'importance d'un  
25 appariement optimal entre le donneur d'organe(s) et le receveur, pour les gènes HLA impliqués donc dans l'histocompatibilité. Une seconde application concerne l'étude de la susceptibilité de chaque individu à développer certaines pathologies induites par des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) ou par d'autres mécanismes encore mal connus (cas des maladies auto-immunes par exemple). Les gènes HLA participent alors  
30 au développement de la très grande diversité de la réponse immunitaire, observée au niveau de chaque individu, pour un groupe ethnique donné. Enfin, la détermination des

allèles des gènes HLA permet une caractérisation ou identification précise de tout individu, constituant un troisième domaine d'application du typage HLA.

Une des difficultés principales du typage HLA réside dans l'homologie structurelle observée pour ces gènes, ceux-ci ayant évolué à partir d'ancêtres communs.

5 Il en résulte que les gènes d'intérêt sont à analyser au sein d'un ensemble de gènes fonctionnels proches, ou de gènes non fonctionnels (pseudogènes). Il est donc essentiel de maîtriser le mieux possible le ciblage de l'analyse des séquences nucléiques, en optimisant les techniques d'amplification des régions à séquencer.

10 Par exemple, le typage HLA-A repose sur l'analyse sélective des deux allèles du gène HLA-A observés chez un individu, en évitant l'analyse des gènes structurellement proches HLA-B et HLA-Cw. Il est donc essentiel de pouvoir amplifier spécifiquement les régions apparentées observées pour le gène HLA-A, en utilisant des amorces nucléotidiques capables de s'hybrider uniquement avec les régions ciblées sur ce gène.

15 Un autre exemple concerne le typage HLA-DR, où l'analyse du polymorphisme ne concerne que les gènes HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 qui correspondent aux gènes codant pour les chaînes polypeptidiques constituant les protéines fonctionnelles exprimées à la surface des cellules, en évitant la co-amplification et l'analyse des pseudogènes HLA-DRB2, HLA-DRB6, HLA-DRB7, HLA-DRB8 et HLA-DRB9. L'exemple du typage HLA-DR illustre la grande complexité du mélange de  
20 séquences nucléiques à identifier rencontrées pour un échantillon donné, et la présence de deux allèles pour chacun des gènes accroît encore la difficulté, rendant parfois l'interprétation des résultats bien délicate (ambiguïtés de typage).

En prenant pour exemple le typage HLA-DR, il peut s'avérer que la simplification de l'analyse puisse être très bénéfique, en restreignant celle-ci uniquement  
25 à l'analyse du gène HLA-DRB1 (avec ses deux allèles pour chaque individu), si les techniques d'analyse moléculaire employées font appel à la détermination d'intensité de signaux (intensité de fluorescence pour des molécules de tailles croissantes pour le séquençage) ou à l'interprétation de profils de réactivité d'hybridation d'oligosondes, par exemple. ~~Cet objectif peut être atteint en sélectionnant des amorces nucléotidiques~~

30 d'amplification spécifiques HLA-DRB1, mais cette approche n'est pas toujours possible du fait des séquences nucléiques observées pour les différents allèles du gène HLA-

DRB1 et des séquences des autres gènes HLA-DRB qui partagent une grande homologie. Une alternative consiste en la présente invention, et repose sur l'utilisation d'un mélange d'amorces spécifiques des gènes HLA-DRB mais non spécifiques du gène HLA-DRB1, et d'amorces bloquantes spécifiques des gènes HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. Il en résulte donc une amplification sélective des gènes HLA-DRB1, permettant la détermination plus facile des deux allèles HLA-DRB1 observés pour un individu donné.

Les amorces nucléotidiques sont synthétisées selon les méthodes traditionnelles comme celles utilisant la synthèse en phase solide par exemple, et sauf indications contraires, comportent un résidu -OH en 3' sur le sucre (3'-OH) permettant leur élongation lors de l'étape d'amplification. Il s'agit essentiellement d'oligonucléotides de longueur comprise entre 10 et 30 mers, selon les applications, ceci dépendant des séquences nucléiques considérées.

Les amorces nucléotidiques bloquantes sont préparées selon les méthodes citées ci-dessus et contiennent un groupement fonctionnel, qui inhibe l'élongation, situé à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide. L'objet de cette fonction bloquante est d'empêcher l'addition par la DNA polymérase, de la base suivante selon l'information lue sur la séquence complémentaire. A titre d'exemple, ce groupement fonctionnel bloquant en 3' peut être un groupement phosphate-alkylamine ( $C_6-NH_2$ ), phosphate ou dabcy, voir à ce sujet la figure 7. Ces groupements protègent la fonction hydroxyle (3'-OH) et bloquent ainsi sa réactivité lors de la polymérisation polynucléotidique catalysée par la DNA polymérase. Le blocage de la polymérisation enzymatique peut être aussi obtenu par déshydroxylation de la position 3'. En effet, des amorces contenant des extrémités 3'-H, 2'-OH peuvent être obtenues en utilisant des réactifs appropriés et la technique d'assemblage oligonucléotidique sur support solide.

Si l'utilisation d'une amorce bloquante non chevauchante avec l'amorce non bloquante doit être envisagée, il peut être avantageux de protéger également l'extrémité 5' de l'amorce bloquante, afin que celle-ci ne soit ni dégradée par l'activité exonucléase de la polymérase, ni déplacée lors de l'élongation de l'amorce non bloquante située plus

en amont (plus en 5') de la région à amplifier. Pour cela, différentes modifications peuvent permettre de maintenir l'intégrité de l'amorce bloquante hybridée sur la séquence nucléique à inactiver. Plusieurs possibilités peuvent être citées à titre d'exemples : le noyau acridine, le diméthoxytrityle (DMT), le groupement thiophosphate, une séquence additionnelle "tige-boucle". De telles modifications sont bien représentées à la figure 8.

Le noyau acridine est un intercalant puissant, il confère ainsi au duplex amorce - séquence cible une très grande stabilité et évite le déplacement de l'amorce. Le diméthoxytrityle (DMT) utilisé comme groupement protecteur de l'extrémité 5'-hydroxyle, le groupement thiophosphate utilisé dans la stratégie antisens, et une séquence additionnelle capable de former une structure secondaire "tige-boucle" protègent l'amorce d'une éventuelle dégradation par une activité exonucléasique.

Modification en 3'	-C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> -phosphate -H -dabcyl
Modification en 5'	-acridine -DMT -thiophosphate -structure " tige-boucle "

Tableau 1 : modifications des extrémités 3' (et) 5' des amorces bloquantes

Le principe d'utilisation de mélanges d'amorces non bloquantes et d'amorces bloquantes, peut être utilisé pour l'extrémité 3' (en aval), ou pour l'extrémité 3' et pour l'extrémité 5' (en amont de la région à analyser), selon les caractéristiques des séquences nucléiques ou selon la complexité des gènes de la région à analyser.

Cette approche d'amplification utilisant des amorces bloquantes peut aussi être appliquée pour des stratégies d'amplification simple correspondant à un mélange d'amorces capables de s'hybrider sur une même séquence nucléique à analyser, ou en multiplex correspondant à plusieurs mélanges d'amorces capables de s'hybrider lors d'une même réaction d'amplification sur différentes séquences nucléiques à analyser (différents loci, différents gènes ou différentes régions de gène).

#### Exemple de synthèse d'amorces oligonucléotidiques bloquées en 3' et en 5'

Les amorces oligonucléotidiques bloquées ont été synthétisées sur un appareil Expidite (Perseptive Biosystems) selon la méthode au phosphoramidite par voie automatique conformément au protocole proposé par le constructeur. Les réactifs phosphoramidites nécessaires à l'introduction des modifications en 3' et en 5' ont été obtenus de chez Glenn Research.

La purification des oligonucléotides est réalisée par HPLC en phase inverse (colonne semi-préparative Beckman ODS 10 mm x 25 cm; C18; 5 µm de porosité; éluant: gradient de 30 min de 10 à 30% d'acétonitrile en mélange avec une solution aqueuse d'acétate de triéthylammonium 0,1 M à pH 7). Les fractions contenant l'oligonucléotide sont collectées et séchées. Les différents oligonucléotides sont ensuite repris dans de l'eau pure et quantifiés par mesure de l'absorption UV.

Pour illustrer le principe de la présente invention, deux exemples d'application dans le domaine HLA sont décrits ci-après.

#### Exemple 1 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB3

Plusieurs gènes HLA-DRB peuvent coder pour une chaîne polypeptidique HLA-DRβ : HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. L'organisation de cet ensemble de gènes fonctionnels transmis de façon héréditaire, varie selon les individus, qui présentent donc différents haplotypes conservés. Si la présence d'un gène HLA-DRB1 est toujours observée, la présence de un ou deux autres gènes (HLA-DRB3,

HLA-DRB4, HLA-DRB5) est facultative, selon l'allèle HLA-DRB1 porté par le même chromosome. Par ailleurs, du fait de la présence des deux haplotypes (un hérité de la mère, l'autre du père), la complexité du mélange des séquences HLA-DRB à analyser est très variable. L'analyse de l'information principale associée aux allèles HLA-DRB1, peut donc être délicate à interpréter selon la présence ou non des autres gènes HLA-DRB, comme par exemple le HLA-DRB3. Il peut donc être avantageux de pouvoir amplifier tous les allèles possibles HLA-DRB1 (184 inscrits à la nomenclature de 1997, *Nomenclature for factors of the HLA system, 1996, Tissue Antigens, 49, 3-II, March 1997*) sans amplifier les allèles HLA-DRB3 éventuellement présents (1 ou 2 allèles possibles parmi les 11 allèles inscrits à la nomenclature de 1997).

Afin d'illustrer l'inhibition spécifique de l'amplification du gène DRB3, deux exemples sont décrits ci-après, le premier en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée par incorporation d'un bras aminé (oligonucléotide 5858, SEQ ID 3) et le second en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée comportant un -H et une extrémité 5' modifiée comportant une acridine (oligonucléotide 5967, SEQ ID 4).

Les ADN ont été extraits selon les techniques classiques de lyse cellulaire, de digestion par la protéinase K, puis purifiés par précipitation éthanolique après extraction phénolique. Les solutions d'ADN (concentration ajustée à 100 ng/μl en H<sub>2</sub>O) sont conservées à 2-8°C.

Les conditions générales d'amplification utilisées ont été les suivantes :

	- Tampon X10	: 10 μl
25	- amorce 5' générique (5867, SEQ ID NO 1) (10μM) (0,1μM final)	: 1 μl
	- amorce 5' bloquante (10μM) (0 à 1,2μM final)	: 0 à 12 μl
	- amorce 3' générique (P2, SEQ ID NO 2) (10μM) (0,1μM final)	: 1 μl
	- dNTP (20mM) (0,2mM final)	: 1 μl
	- Taq-polymerase (5UI/μl) (1,5U)	: 0,3 μl
30	- ADN (100ng/μl) (100ng)	: 1 μl
	- H <sub>2</sub> O (QSP)	: 100 μl

Les caractéristiques du programme d'amplification utilisé avec un appareil Perkin Elmer GeneAmp 9600, ont été les suivantes :

- 2 min à 95°C (1 cycle)
- 5 30 sec à 95°C + 30 sec à 55°C + 30 sec à 72°C (32 cycles)
- 7 min à 72°C (1 cycle)

Les produits d'amplification obtenus ont été contrôlés en analysant une partie aliquote (5µl) par électrophorèse en gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium. Après ce contrôle, les amplicons préparés ont été analysés avec le coffret  
10 bioMérieux de typage HLA-DR oligodetection (réf. 74 500). Ce test permet de déterminer le typage HLA-DR par technique d'hybridation reverse en microplaques, par détection et analyse des allèles HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 (PCT/FR92/00702).

15 **Blocage DRB3 avec oligo 5'-phosphate / 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> :**

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1\*1301, DRB3\*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1 µM final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1 µM final

20 Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5858, SEQ ID NO 3) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 µM final

Hybridation en microplaque :

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 2 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5858 ( $\mu$ M)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	> 2500	723	928
0.3	2109	578	101
0.6	1901	563	29
0.9	1759	374	31
1.2	1719	503	12

Ratio 0.6 / 0	0.76	0.78	0.03
---------------	------	------	------

Tableau 2 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5858 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M par rapport à la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

Les sondes 13 et 3+6 sont spécifiques du gène DRB1, et la sonde 52a est spécifique du gène DRB3. L'addition d'oligonucléotide 5858 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.6  $\mu$ M et plus.

Séquençage :

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB3, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready



Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9  $\mu\text{M}$  d'oligonucléotide 5858.

- 5 Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB3 (Figures 9 et 10).

Séquence attendue pour	5' > 3'									
	56			60					65	
DRB1*1301	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG GAC
DRB3*01	CCT	GTC	GCC	GAG	TCC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG GAC
DRB1*1301+DRB3*01 (forward)	CCT	GWY	GCC	GAG	TMC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG GAC
DRB1*1301+DRB3*01 (reverse)	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC CTG
Séquence lue pour										
essai sans blocage	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC CTG
essai avec blocage (0.9 $\mu\text{M}$ )	GGA	CTA	CGG	CTC	ATG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC CTG

- 10 Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB3 (oligonucléotide 5858, 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>) inhibe l'amplification du gène DRB3 comme le montre la disparition des bases apparentées en position 57 et 60, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB3\*01.

15

#### **Blocage DRB3 avec oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H**

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1\*1301, DRB3\*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1  $\mu\text{M}$  final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1  $\mu\text{M}$  final

- 20 Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5967, SEQ ID NO 4) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2  $\mu\text{M}$  final

Hybridation en microplaque :

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 3 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5967 ( $\mu$ M)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	2356	907	893
0.3	1227	251	5
0.6	1395	239	0
0.9	799	185	4
1.2	965	161	0

Ratio 0.6 / 0	0.60	0.30	0
---------------	------	------	---

Tableau 3 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5967 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

10

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

Là encore, l'addition d'oligonucléotide 5967 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.3  $\mu$ M et plus.

15

Exemple 2 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB4

20

La situation est comparable à celle décrite dans l'exemple 1. Afin de simplifier l'interprétation du typage HLA-DRB1, il peut être avantageux de limiter l'amplification

HLA-DRB avec les amorces HLA-DRB génériques, au gène DRB1, sans co-amplification du gène DRB4. La présente invention décrit l'utilisation d'amorces spécifiques DRB4 bloquantes.

5 Les protocoles expérimentaux sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1.

ADN : lignée T7526 (ECCAC 9076), DRB1\* 0901, DRB4\*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1  $\mu$ M final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1  $\mu$ M final

10 Amorce HLA-DRB4 bloquante 5' (oligonucléotide 5965, SEQ ID NO 5) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2  $\mu$ M final

Hybridation en microplaque :

15 Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 4 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5965 ( $\mu$ M)	Sonde 9	Sonde 53
0	1769	1320
0.3	1935	110
0.6	1754	41
0.9	1750	29
1.2	1516	14
Ratio 0.6 / 0	0.99	0.03

20 Tableau 4 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5965 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB4.

La sonde 9 est spécifique du gène DRB1, et la sonde 53 est spécifique du gène DRB4. L'addition d'oligonucléotide 5965 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB4, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB4 bloquant de 0.6  $\mu$ M et plus.

#### 10 Séquençage :

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB4, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9  $\mu$ M d'oligonucléotide 5965.

Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB4 (Figures 11 et 12).

20

Séquence attendue pour	5' > 3'																			
	30					35					40					45				
DRB1*0901	AGA	GGC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	AAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	
DRB4*01	AGA	TAC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	TAC	GCG	CGC	TAC	AAC	AGT	GAC	CTG	GGG	GAG	TAC	
DRB1*0901+DRB4*01 (forward)	AGA	KRC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	WAC	GYG	CGC	TWC	RAC	AGY	GAC	STG	GGG	GAG	TAC	
DRB1*0901+DRB4*01 (reverse)	TCT	MYG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	WTG	CRC	GCG	AWG	YTG	TCR	CTG	SAC	CCC	CTC	ATG	
Séquence lue pour																				
essai sans blocage	TCT	MYG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	WTG	CRC	GCG	AWG	YTG	TCR	CTG	SAC	CCC	CTC	ATG	
essai avec blocage (0.9 $\mu$ M)	TCT	CCG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	TTG	CAC	GCG	AAG	CTG	TCG	CTG	CAC	CCC	CTC	ATG	

Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB4 (oligonucléotide 5965, 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>) inhibe l'amplification du gène DRB4 comme le montre la disparition des bases

apparentées en positions 30, 37, 38, 40, 41, 42 et 44, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB4\*01.

La présente invention peut être appliquée au typage HLA-DRB1 de haute résolution, le blocage spécifique de l'amplification spécifique des gènes HLA-DRB3, -  
5 DRB4, -DRB5 et des pseudogènes HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 et -DRB9 par l'utilisation d'amorces bloquantes réduisant l'analyse à un mélange de une (cas d'un échantillon homozygote) ou de deux séquences nucléotidiques (cas d'un échantillon hétérozygote). Une telle stratégie utilise des amorces bloquantes HLA-DRB3  
10 spécifiques (oligonucléotides 5816 (SEQ ID NO 6), 5868 (SEQ ID NO 7), 5885 (SEQ ID NO 8) à titre d'exemples), des amorces HLA-DRB4 spécifiques (oligonucléotides 5883 (SEQ ID NO 9), 5916 (SEQ ID NO 10), 5917 (SEQ ID NO 11) à titre d'exemples) et des amorces HLA-DRB5 spécifiques (oligonucléotides 5021 (SEQ ID NO 12), 5870 (SEQ ID NO 13), 5871 (SEQ ID NO 14), 5881 (SEQ ID NO 15), 5902 (SEQ ID NO 16), 5903 (SEQ ID NO 17), 5913 (SEQ ID NO 18), 5914 (SEQ ID NO  
15 19) à titre d'exemples), modifiés en leurs extrémités 3' et 5' comme décrit plus haut.

Un blocage complet des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 peut être réalisé en utilisant un mélange d'amorces bloquantes.

Dans le tableau 5 qui suit, i représente l'inosine.

Référence bioMérieux	SEQ ID NO	Séquence nucléotidique (5' > 3')	Modif <sup>o</sup> en 5'	Modif <sup>o</sup> en 3'
5867	1	ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CG	-	-
P2	2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G	-	-
5858	3	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5967	4	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-acridine	-H
5965	5	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	..C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5816	6	CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5868	7	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5885	8	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT	-	-
5883	9	CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iiA	-	-
5916	10	CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5917	11	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5021	12	CA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5870	13	CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5871	14	CA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5881	15	CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5902	16	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5903	17	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5913	18	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-
5914	19	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-

Tableau 5 : séquence nucléotidique des oligonucléotides utilisés comme  
amorces pour l'amplification

5

L'inosine, base non naturelle, est utilisée afin de fragiliser l'hybride acide nucléique - amorce de blocage. En effet, l'inosine est relié à son nucléotide

complémentaire par deux liaisons hydrogènes et donc lorsqu'on la substitue à une pyrimidine, la liaison entre les deux brins, à son niveau, est plus faible. Un gène pouvant varier d'autres gènes apparentés par une seule base, il est intéressant de substituer sur l'amorce de blocage, complémentaire du gène, les bases autour de cette position cruciale  
5 par des inosines. Le duplex acide nucléique - amorce de blocage devenant ainsi fragilisé, il ne peut y avoir hybridation que si l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence génique cible. On renforce ainsi la spécificité de l'amorce de blocage.

La présente invention concerne donc un procédé d'amplification sélective de gènes présents dans un mélange de gènes apparentés, par utilisation d'amorces  
10 oligonucléotidiques bloquantes correspondant à des oligonucléotides comportant une extrémité 3' modifiée ne permettant pas leur élongation lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles.

L'invention concerne également l'utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit dans la revendication 1, comportant une extrémité 5' modifiée ne permettant pas leur déplacement ou leur dégradation, lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes  
15 cibles par une amorce spécifique d'une région située plus en 5' sur le même gène.

Dans le cas d'une utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit ci-dessus la modification à l'extrémité 5' est facultative. Ainsi, deux possibilités différentes existent.

Selon un premier mode d'utilisation, le groupement -OH en 3' est remplacé par  
20 un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -H, -phosphate, -dabcyl, ou une chaîne carbonée terminée par un groupement -NH<sub>2</sub>, à titre d'exemples.

Selon un second mode d'utilisation, le groupement -phosphate en 5' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un  
25 groupement -DMT, acridine, -thiophosphate, ou une structure "tige-boucle", à titre d'exemples.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, peuvent aussi comporter des modifications de l'oligonucléotide en position non terminale et sont utilisées afin de favoriser leur hybridation sur leurs séquences cibles.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, sont capables de s'hybrider sur le brin codant ou sur le brin complémentaire (utilisation d'amorces bloquantes 5' ou d'amorces bloquantes 3').

Il est également possible d'utiliser une amorce bloquante ou un mélange  
5 d'amorces bloquantes.

L'utilisation d'amorces bloquantes est particulièrement intéressante pour les méthodes d'amplification des séquences cibles, comme par exemple la PCR, la TMA ou tout autre technique.

L'invention concerne enfin l'utilisation d'une ou de plusieurs amorces bloquantes  
10 pour l'inhibition de l'amplification des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5, choisies parmi celles qui sont définies par les séquences SEQ ID Nos :3 à 19, et leurs complémentaires.

---



## REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le  
5 mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide  
10 nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

15

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

20

3. Amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

25

4. Amorce, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

30

5. Amorce, selon la revendication 4, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

6. Amorce, selon la revendication 5, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

5           7. Amorce, selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique.

10

8. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

15

9. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée par le fait que l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

20

10. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides modifiés, qui constituent cette boucle.

25

11. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est constitué d'une "queue" de polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

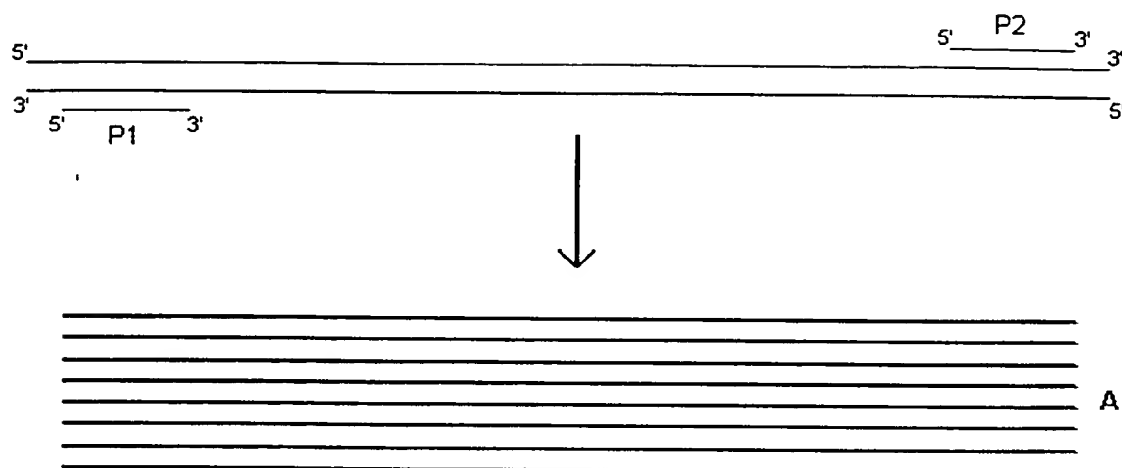
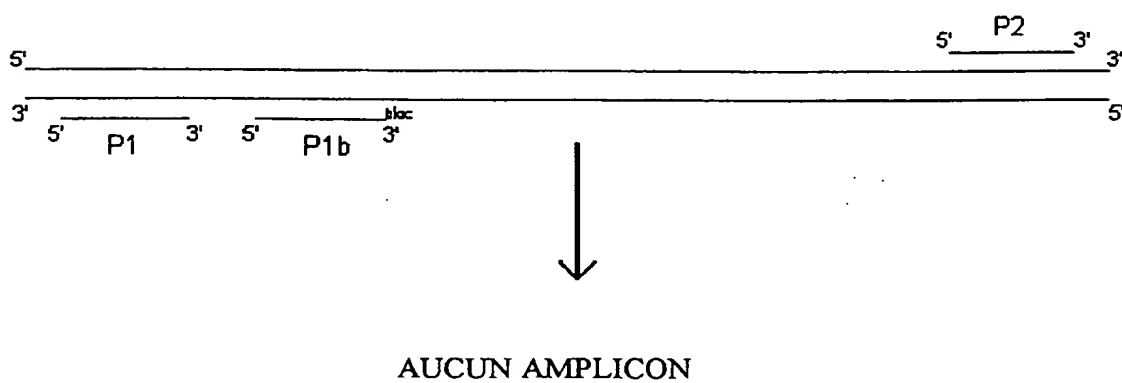
30

12. Amorce dans laquelle l'élément ne permet pas l'élongation, selon l'une quelconque des revendications 4, 5 ou 7 à 11, caractérisée par le fait que

l'élément substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou du groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

- 5                    13. Amorce dans laquelle l'élément est protecteur, selon l'une quelconque des revendications 4, 6 à 12, caractérisée par le fait que l'élément est :
- substitué au phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
  - greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5'
- 10                    de l'acide nucléique.

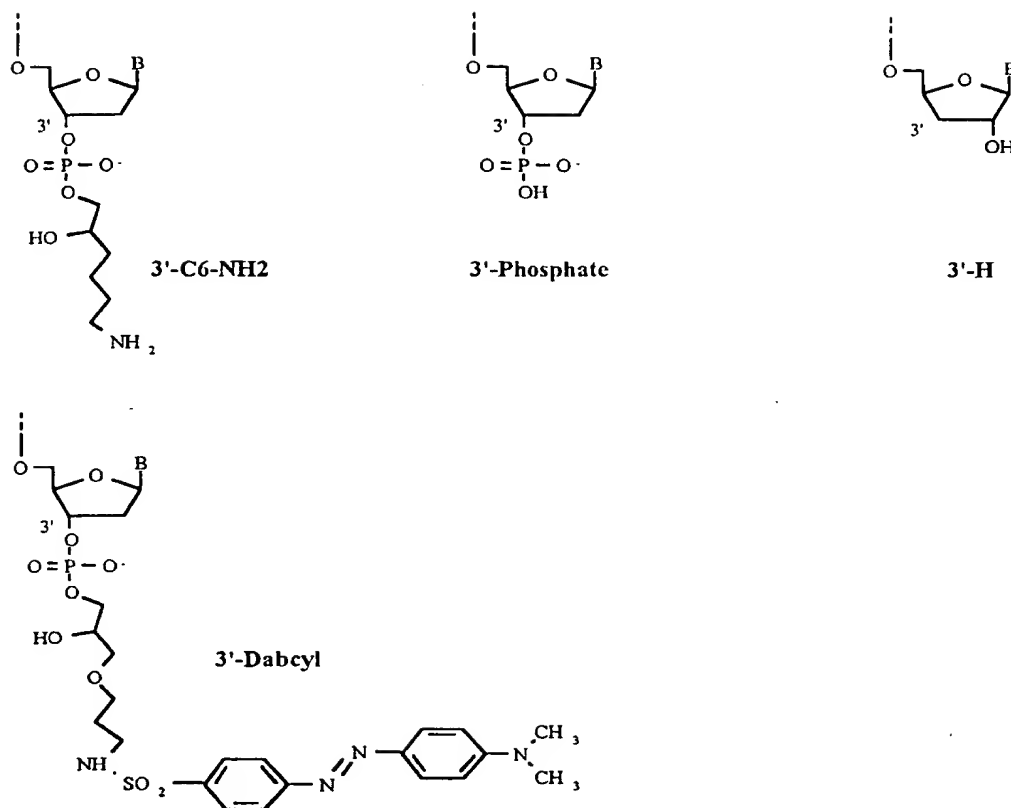
1/7

Fig. 1Fig. 2

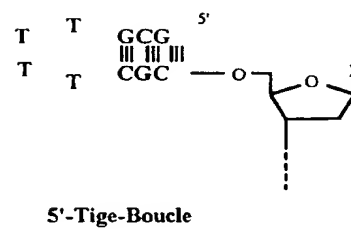
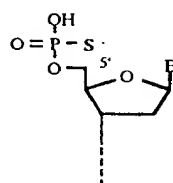
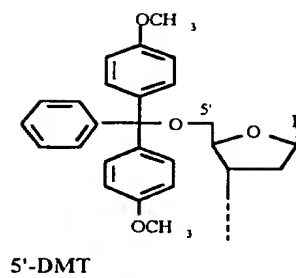
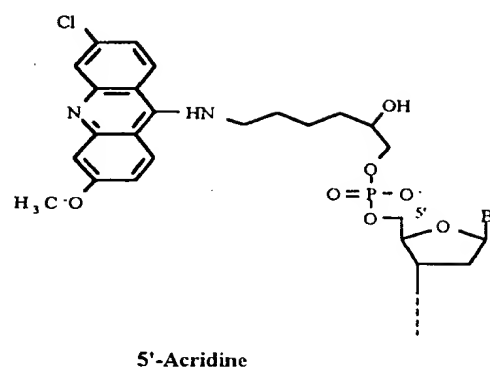
2/7

Fig. 3Fig. 4Fig. 5Fig. 6

3/7

Fig. 7

4/7

**Fig. 8**

517

3' 60 57 5'  
TCCITCTGGCTGTTCCAGKACTCGGCRWCAGG

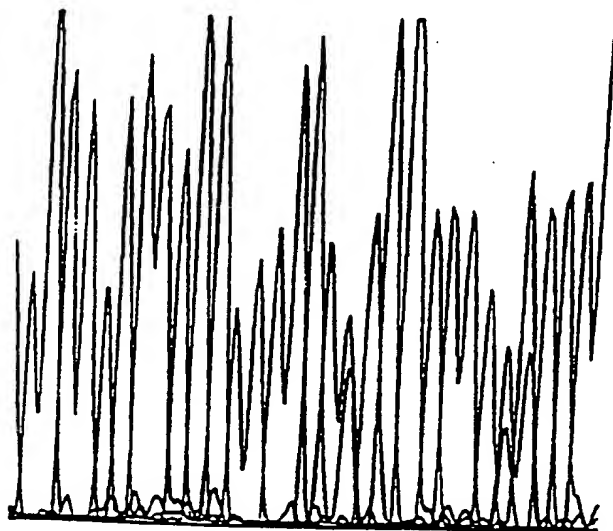


Fig. 9

3' TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGCATCAGG 5'

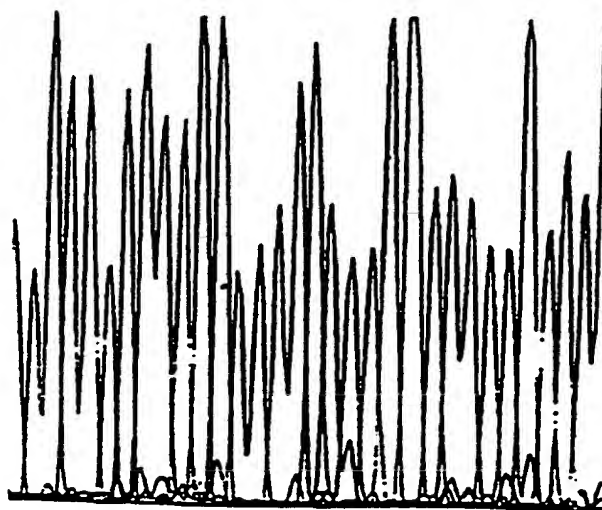
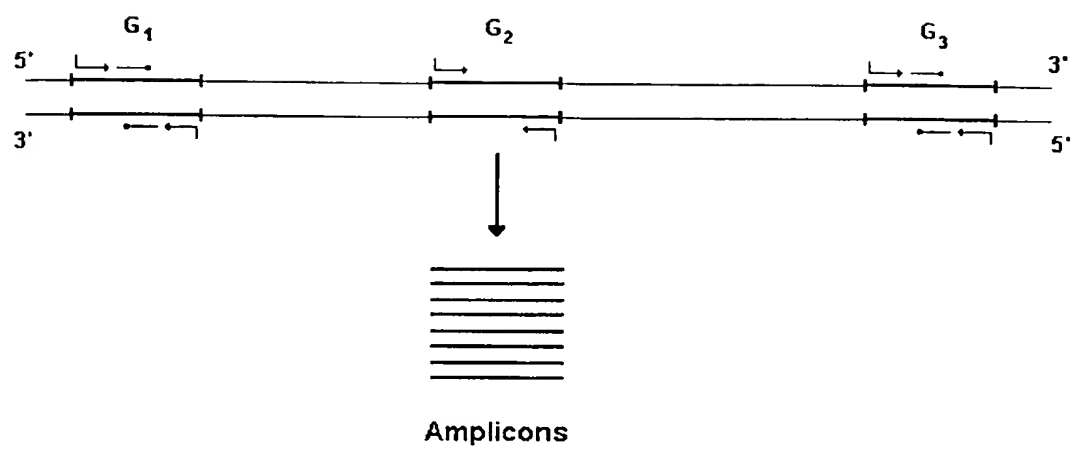


Fig. 10





7/7



→ Amorce d'amplification

← Amorce bloquante

Fig. 13

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: BIOMERIEUX  
(B) RUE: CHEMIN DE L'ORME  
(C) VILLE: MARCY L'ETOILE  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 69280

- (ii) TITRE DE L'INVENTION: Procédé d'amplification d'au moins une  
séquence nucléotidique particulière et  
amorces mises en oeuvre

## (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 19

## (iv) ADRESSE DE CORRESPONDANCE:

- (A) NOM: Cabinet GERMAIN & MAUREAU  
(B) RUE: 12 rue Boileau  
(C) VILLE: LYON  
(D) PAYS: FRANCE  
(E) CODE POSTAL: 69006  
(F) TELEPHONE: 04 72 69 84 30  
(G) TELEFAX: 04 72 69 84 31

## (v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: disquette 3,5 pouces DS, HD  
(B) ORDINATEUR: EPSON (compatible IBM)  
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION: DOS  
(D) LOGICIEL: MICROSOFT WORD POUR WINDOWS

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATCCTTCGTG TCCCCACAGC ACG

23

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

10 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TCGCCGCTGC ACTGTGAAG

19

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

20 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMBLEMMENT : 24 (extrémité 3')

25 (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMLACEMENT : 1 (extrémité 5')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe  
acridine

## 5 (ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMLACEMENT : 24 (extrémité 3')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par H

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

10 CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- 15 (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE :

- 20 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMLACEMENT : 24
- (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

## (ix) CARACTERISTIQUE :

- 25 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMLACEMENT : 26 (extrémité 3')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe  
C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

30 CCCACAGCAC GTTTCTTGGA GCAGGC

26

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- 35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CCCAGCACGT TTCTTGGAGC T

21

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

10 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT

24

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

20 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMLACEMENT : 23

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGGT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMPLACEMENT : 22  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
5 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMPLACEMENT : 23  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:  
CATTTCCTCA ATGGGACGGA GGGA 24
- 10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
15 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
(A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
20 (B) EMPLACEMENT : 24  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:  
CCCCCAGCAC GTTCTTGGA GCAGGC 26
- 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
30 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
(A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
35 (B) EMPLACEMENT : 24  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCACAGCAC GTTCTTGGA GCAGGC

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CACGTTTCTT GCAGCAGGA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 15 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CAGCAGGTTT CTTGCAGCAG GA

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30 (ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMBLEMMENT : 3  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

35 CAGGTTTCTT GCAGCAGGA

19



## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

10 (B) EMPLACEMENT : 6

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CAGCAGGTTT CTTGCAGCAG GA

22

## 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

20 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

25 (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CCCCCAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

## 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

## 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

5 CCCACAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

10 (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

15 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

20 (B) EMPLACEMENT : 25

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CCCACAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

35 (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 25

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

5 CCCCCAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01247

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C1201/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 293 238 A (INCELTEC LTD ;WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 March 1996 (1996-03-20) the whole document	1-5,7-9, 12
Y	LEWIS A P ET AL.: "Taq DNA polymerase extension of internal primers blocks polymerase chain reactions allowing differential amplification of molecules with identical 5' and 3' ends." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 14, 1994, pages 2859-2861, XP002092519 the whole document	1-9,13
Y	US 5 573 907 A (CARRINO JOHN J ET AL) 12 November 1996 (1996-11-12) the whole document	1-9,12, 13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1999

Date of mailing of the international search report

02/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2293238 A	20-03-1996	NONE	
US 5573907 A	12-11-1996	AU 4687393 A CA 2140331 A EP 0654093 A JP 8501212 T US 5516663 A WO 9403636 A AT 137269 T AU 635105 B AU 7000791 A CA 2035010 A,C DE 69118930 D DE 69118930 T EP 0439182 A ES 2089038 T JP 1980321 C JP 4211399 A JP 6036760 B KR 9513953 B KR 9602235 B US 5792607 A US 5453355 A US 5427930 A	03-03-1994 17-02-1994 24-05-1995 13-02-1996 14-05-1996 17-02-1994 15-05-1996 11-03-1993 01-08-1991 27-07-1991 30-05-1996 09-01-1997 31-07-1991 01-10-1996 17-10-1995 03-08-1992 18-05-1994 18-11-1995 13-02-1996 11-08-1998 26-09-1995 27-06-1995
WO 9707235 A	27-02-1997	CA 2229226 A EP 0845047 A JP 11502124 T	27-02-1997 03-06-1998 23-02-1999
WO 9403630 A	17-02-1994	AU 676197 B AU 4802793 A CA 2141537 A EP 0658212 A FI 950487 A JP 7509371 T NO 950402 A PL 307341 A	06-03-1997 03-03-1994 17-02-1994 21-06-1995 10-03-1995 19-10-1995 03-04-1995 15-05-1995
WO 9640992 A	19-12-1996	CA 2223050 A EP 0832280 A US 5814492 A	19-12-1996 01-04-1998 29-09-1998
WO 9828443 A	02-07-1998	CA 2246225 A EP 0904412 A	02-07-1998 31-03-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 99/01247

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C1201/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C120

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GB 2 293 238 A (INCELTEC LTD ; WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 mars 1996 (1996-03-20) le document en entier ---	1-5, 7-9, 12
Y	LEWIS A P ET AL.: "Taq DNA polymerase extension of internal primers blocks polymerase chain reactions allowing differential amplification of molecules with identical 5' and 3' ends." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 14, 1994, pages 2859-2861, XP002092519 le document en entier ---	1-9, 13
Y	US 5 573 907 A (CARRINO JOHN J ET AL) 12 novembre 1996 (1996-11-12) le document en entier ---	1-9, 12, 13
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/01247

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2293238	A	20-03-1996	AUCUN	
US 5573907	A	12-11-1996	AU 4687393 A	03-03-1994
			CA 2140331 A	17-02-1994
			EP 0654093 A	24-05-1995
			JP 8501212 T	13-02-1996
			US 5516663 A	14-05-1996
			WO 9403636 A	17-02-1994
			AT 137269 T	15-05-1996
			AU 635105 B	11-03-1993
			AU 7000791 A	01-08-1991
			CA 2035010 A,C	27-07-1991
			DE 69118930 D	30-05-1996
			DE 69118930 T	09-01-1997
			EP 0439182 A	31-07-1991
			ES 2089038 T	01-10-1996
			JP 1980321 C	17-10-1995
			JP 4211399 A	03-08-1992
			JP 6036760 B	18-05-1994
			KR 9513953 B	18-11-1995
			KR 9602235 B	13-02-1996
			US 5792607 A	11-08-1998
			US 5453355 A	26-09-1995
			US 5427930 A	27-06-1995
WO 9707235	A	27-02-1997	CA 2229226 A	27-02-1997
			EP 0845047 A	03-06-1998
			JP 11502124 T	23-02-1999
WO 9403630	A	17-02-1994	AU 676197 B	06-03-1997
			AU 4802793 A	03-03-1994
			CA 2141537 A	17-02-1994
			EP 0658212 A	21-06-1995
			FI 950487 A	10-03-1995
			JP 7509371 T	19-10-1995
			NO 950402 A	03-04-1995
			PL 307341 A	15-05-1995
WO 9640992	A	19-12-1996	CA 2223050 A	19-12-1996
			EP 0832280 A	01-04-1998
			US 5814492 A	29-09-1998
WO 9828443	A	02-07-1998	CA 2246225 A	02-07-1998
			EP 0904412 A	31-03-1999